



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Conservación de oca (*Oxalis tuberosa*) bajo condiciones
in vitro y corroboración de la estabilidad genética**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Rubén Darío FERRO MAURICIO

ASESOR

Héctor Javier SÁNCHEZ SOTOMAYOR

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ferro, R. (2021). *Conservación de oca (Oxalis tuberosa) bajo condiciones in vitro y corroboración de la estabilidad genética*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-1408-3340
DNI o pasaporte del autor	DNI: 73260544
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-3565-7171
DNI o pasaporte del asesor	DNI: 06002430
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Bioeconomía
Agencia financiadora	<p>Dos Financiadores:</p> <p>1)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nombre: Instituto Nacional de Innovación Agraria - MIDAGRI ✓ Siglas: INIA <p>País de la agencia financiadora:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Perú <p>Nombre del programa financiero</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) <p>2)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Nombre: Vicerrectorado de Investigación y Posgrado-UNMSM ✓ Siglas: VRIP-UNMSM <p>País de la agencia financiadora:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Perú <p>Nombre del programa financiero</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Promoción de tesis de pregrado 2018 <p>Código</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ B18100684
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Lugar:</p> <p>1) Instituto Nacional de Innovación Agraria</p> <p>País: Perú, Departamento: Lima, Provincia: Lima, Distrito: La Molina</p>

	<p>Coordenadas geográficas: 12°4'36" S, 76°56'43" W (-12.07664, -76.94252)</p> <p>2) Universidad Nacional Mayor de San Marcos</p> <p>País: Perú, Departamento: Lima, Provincia: Lima, Distrito: Lima</p> <p>Coordenadas geográficas: 12°3'30" S, 77°5'0" W (-12.058333, -77.083333)</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2017-2020
Disciplinas OCDE	<p>Genética, Herencia, Biotecnología Agrícola</p> <p>http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 15:05 horas del 22 de enero de 2021, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/jcm-vxqi-psq>, el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **RUBÉN DARÍO FERRO MAURICIO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210000127, el titulado expuso su tesis: **“CONSERVACIÓN DE OCA (*Oxalis tuberosa*) BAJO CONDICIONES *IN VITRO* Y CORROBORACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: APROBADO CON MÁXIMOS HONORES

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **RUBÉN DARÍO FERRO MAURICIO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 22 de enero de 2021.

Mg. MERY SUNI NINATAYPE
(PRESIDENTA)

Blgo. HECTOR SANCHEZ SOTOMAYOR
(ASESOR)

Mg. ESTHER COX RAMOS
(MIEMBRO)



Firmado digitalmente por ARBAIZA
PRADO Lourdes Elena FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 22.01.2021 19:02:06 -05:00

Blga. ELENA ARBAIZA PRADO
(MIEMBRO)

Dedicatoria y Agradecimientos

Esta tesis la dedico a mi familia, a mi padres Rolando y Marlene que día a día fueron el ejemplo a seguir además de su apoyo incondicional para cumplir esta labor, a mis hermanos Eliot, Heinz y Viviana, que tuvieron que aguantar mis momentos de estrés y a la vez amenizar mis días cuando era necesario, a mis sobrinos Davicito, John, Saúl, Joan y Emilia que siempre consultan qué estudio y qué es eso sobrina Emilia, todos mis familiares como mis primos Lisset, Maycool, Milagros, John, David, Noelia, Wendy, a mis tíos Lupe, Oscar, Roberto, Alfredo, Angélica y Delia (QEPD), mi abuela “Ginia”, que aunque con dificultad para entender mi profesión siempre valoraron el esfuerzo y apoyaron mi causa a ojos cerrados.

A Heily, porque fue la que me empujo a empezar con esto, creyó en mí más de lo que yo creía, la ayuda y comprensión incondicional en todo este tiempo, en las buenas y malas; y a su familia que me apoyó cada vez que pudo siendo un sostén para algunos momentos.

A los grandes amigos que conocí en el LRGB de la UNMSM donde aprendí en conjunto con mis compañeros Gonzalo, Bianca, Guido, Shellah, José y Ana que nos esforzamos para sacar algo bonito adelante, a los profesores Rolando, Héctor y Indira que fueron los primeros en generarme curiosidad por esta área de investigación. A los colegas de trabajo, muchos de ellos tesisistas: Doris, Johan, Jordan, Karen, Jessica, Diego y Ralph y todo el grupo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la SDB con quienes compartí muchísimas experiencias por las que estoy agradecido; a los especialistas Diolisa, Jorge, Claudia, Wendy y Elizabeth que me enseñaron tanto para mi desarrollo profesional, a los doctores Julio, Carlos, Diego, Yolanda, Evelyn y Cinthya que me abrieron los ojos a diferentes perspectivas de investigación; a los técnicos Olegario, Juan e Iris que me

apoyaron y facilitaron el uso de equipos y ambientes, incluso sacrificando horas de descanso.

A mi *alma mater*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, porque a pesar de los años siempre recibe a sus hijos con los brazos abiertos, que a pesar de las dificultades encuentra la forma de salir adelante y espero eso no cambie nunca, y que alberga un grupo humano de gran calidad, destacando propiamente los profesores que nunca dejan de esforzarse por ser un ejemplo a sus alumnos tanto en lo humano como en lo profesional, y sus estudiantes cuya capacidad siempre ha sido admirable y aún me siento afortunado de compartir aulas con tal grupo humano de la Base 12 de Genética y biotecnología, con quienes viví una hermosa etapa en mi vida.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) que financió todo este trabajo y el proyecto en su conjunto, siendo un esfuerzo del Estado Peruano para apoyar a la investigación en el país, que de verdad necesita todo tipo de apoyo.

Abreviaturas

%	Concentración correspondiente a 1 g de compuesto por 100 mL de solución
ANOVA	Análisis de Varianza
AUDPC	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Area under disease progress curve)
CIP	Centro Internacional de la Papa
E.E.A.	Estación Experimental Agraria
Fig.	Figura
g/L	Gramos por Litro
IPGRI	Instituto Nacional de Recursos Fitogenéticos
ISSRs	Inter-secuencia de repetición simple (Inter-simple sequence repeats)
Lux	Unidad de medida de iluminancia (Lumen/m ²)
MCA	Análisis de correspondencia múltiple (Multiple Correspondence Analysis)
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
ppm	Partes por millón
PCoA	Análisis de componentes principales (Principal Components Analysis)
pH	Potencial de hidrógeno

RAPDs	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)
ROS	Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)
RR.GG	Recursos Genéticos
SSRs	Secuencia de Repetición Simple (Simple sequence repeats)

ÍNDICE

Resumen	8
Abstract	9
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Conservación de Recursos Genéticos.....	5
2.1.1. Cultivo de Tejidos Vegetales.....	6
2.2. Estabilidad Genética	10
2.3. <i>Oxalis tuberosa</i> Mol.....	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
3.1. Hipótesis.....	13
3.2. Objetivos	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Materiales	15
4.2. Medio de Conservación.....	17
4.2.1. Tratamientos y siembra.....	17
4.2.2. Descriptores para evaluación de los explantes en el medio de conservación.....	20
4.3. Regeneración en Medio Control.....	25
4.4. Caracterización Morfológica del Material Biológico.....	26
4.5. Caracterización Genética del Material Biológico.....	27
5. RESULTADOS	29
5.1. Evaluación de Conservación <i>in vitro</i>	29
5.2. Prueba de Supervivencia con los Medios de Conservación	46
5.3. Regeneración en Medio Control.....	49
5.4. Caracterización Morfológica del Material Biológico.....	53
5.5. Caracterización Molecular del Material Biológico	55
6. DISCUSIÓN	57
6.1. Medios de conservación más adecuado.....	57
6.2. Regeneración en medio control	64
6.3. Verificación de la estabilidad morfológica y genética	66
7. CONCLUSIONES	71
8. RECOMENDACIONES	72

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
10. ANEXOS.....	85
ANEXO 1.....	85
ANEXO 2.....	85
ANEXO 3.....	85
ANEXO 4.....	87
ANEXO 5.....	89
ANEXO 6.....	95
ANEXO 7.....	100
ANEXO 8.....	100
ANEXO 9.....	101
ANEXO 10.....	103
ANEXO 11.....	105

Resumen

Oxalis tuberosa Mol., comúnmente denominada oca es una especie que es conservada en el banco de germoplasma del INIA, teniendo más de 1800 accesiones conservadas en campo y aproximadamente 300 conservadas en un banco in vitro. Las características propias de esta especie en condiciones in vitro como la cantidad alta de fenolización del medio o un rápido crecimiento hacen necesario el constante subcultivo de esta especie, lo que resulta en un alto consumo de reactivos y horas de trabajo del personal técnico. Como solución a dicha problemática y considerando la necesidad de conservar todas las accesiones en el banco de germoplasma por motivos de seguridad alimentaria, el presente trabajo prueba 12 medios de conservación in vitro para oca. Se trabajó con la modificación de 3 componentes en el medio (sucrosa, sorbitol y ácido ascórbico) resultando en 12 tratamientos, además usamos 4 accesiones distintas y se evaluó las características relacionadas a la longitud y número de nudos del explante, características del tejido como la clorosis, defoliación, enraizamiento, necrosis y la fenolización del medio y viabilidad de los tejidos. Los resultados más resaltantes corresponden al tratamiento T11, que contiene 40 g/L de sucrosa, 20 g/L de sorbitol y 100 mg de ácido ascórbico, demostrando mejores características en sus tejidos por un mayor periodo posible y presentando un alto porcentaje de supervivencia luego de 17 meses de evaluación. Complementamos el experimento con la regeneración de los nudos en medio de regeneración y su evaluación a nivel morfológico y genotípico haciendo uso de marcadores de CGIAR/CIP e iniciadores para SSRs diseñados en esta especie, demostrando así que se mantiene la constitución genómica de los clones procedentes de la misma accesión luego de someterse a estos procedimientos de estrés.

Palabras Clave: oca, medio de conservación, sucrosa, sorbitol, ácido ascórbico, marcadores morfológicos, marcadores moleculares.

Abstract

Oxalis tuberosa Mol., Commonly called oca, is a species that is conserved in the INIA germplasm bank, having more than 1800 accessions conserved in the field and approximately 300 conserved in an in vitro bank. The characteristics of this species in in vitro conditions such as the high amount of phenolization of the medium or a rapid growth make it necessary to constantly subculture this species, which results in a high consumption of reagents and hours of work for technical personnel. As a solution to this problem and considering the need to conserve all the accessions in the germplasm bank for food safety reasons, the present work tests 12 in vitro conservation means for oca. We worked with the modification of 3 components in the medium (sucrose, sorbitol and ascorbic acid) resulting in 12 treatments, also we used 4 different accessions and the characteristics related to the length and number of nodes of the explant, tissue characteristics such as chlorosis, defoliation, rooting, necrosis and phenolization of the media and viability of the tissues were evaluated. The most outstanding results correspond to the T11 treatment, which contains 40 g/L of sucrose, 20 g/L of sorbitol and 100 mg of ascorbic acid, showing better characteristics in their tissues for a longer possible period and presenting a high percentage of survival afterwards. 17 months of evaluation. We complemented the experiment with the regeneration of the nodes in the middle of regeneration and their evaluation at the morphological and genotypic level making use of CGIAR / CIP markers and initiators for SSRs designed in this species, thus demonstrating that the genomic constitution of the clones provided is maintained of the same accession after undergoing these stress procedures.

Key words: oca, medium conservation, sucrose, sorbitol, ascorbic acid, morphological markers, molecular markers.

1. INTRODUCCIÓN

Oxalis tuberosa Mol., comúnmente denominada Oca es una planta tuberosa andina, una hierba postrada de crecimiento compacto que pertenece a la familia Oxalidaceae y se distribuye abundantemente en Bolivia, Ecuador y Perú aunque puede encontrarse en Argentina, Chile, Colombia y Venezuela; es la segunda tuberosa andina de importancia a nivel nacional, cuyas características únicas la convierten en una especie promisoría a nivel mundial, siendo ya producida en Nueva Zelanda, Inglaterra y México (Grau y Halloy, 1984) y con capacidad de ser cultivada en Estados Unidos, tierras altas de Asia (Nepal) y África (Ruanda y Burundi) (Vietmeyer, 1984).

En la alimentación del poblador andino, la obtención de proteínas corresponde al consumo de quinua, cañihua, kiwicha o carne de origen animal, los minerales son obtenidos de la maca, las vitaminas de los frutales andinos como aguaymanto y tomate de árbol, y los carbohidratos son obtenidos a partir de las tuberosas. Debido a esto propiamente la oca, el ulluco y la mashua cumplen un rol importante en la alimentación del poblador andino, en especial la oca que por sus características únicas de resistencia a condiciones ambientales poco óptimas, es el único tubérculo que permite ser cultivado y aprovechado como fuente de carbohidratos en altitudes superiores a 4,000 msnm (Ayala, 2004).

En la actualidad, la conservación de oca se da por metodologías *in situ*, en este aspecto las fincas de agricultores identifican microcentros de agrodiversidad y ferias de conservación de semillas. Los microcentros de agrodiversidad son áreas geográficas cuyas condiciones ambientales, los sistemas de producción agropecuarios y sus costumbres y culturas posibilitan la supervivencia y uso de su agrodiversidad; mientras que las ferias de conservación de semillas son espacios donde agricultores de comunidades diferentes pueden intercambiar los diferentes genotipos que conservan.

Estos tipos de conservación se realizan como resultado de siembras anuales de los tubérculos, que presenta dificultades debido al costo de mantenimiento, el riesgo de contaminación por diferentes patógenos, de difícil detección y control, que causan la pudrición de los tubérculos y contaminación del campo (Cortés, 1984; Delgado, 1982; Estrella, 1983). Considerar que como otras tuberosas, esta especie es susceptible a infectarse sistémicamente por virus, plántulas que producen tubérculos contaminados que por costumbre agrícola son usados como semilla para la próxima campaña, lo que reduce el rendimiento de las posteriores cosechas dando lugar a lo que se denomina semilla cansada (Álvarez *et al.*, 1992).

Dada la importancia ya mencionada y sus características como un cultivo promisorio, es de suma prioridad la conservación de la diversidad genética de *Oxalis tuberosa* Mol. frente a la erosión genética del medio ambiente, debido a los beneficios directos que puede derivar de la explotación de los cultivos agrícolas y hortícolas mejorados. Por lo cual se hace uso de ciertas metodologías de investigación como el cultivo de tejidos vegetales, siendo esta metodología dirigida a plantas de semilla recalcitrante, que presentan autoincompatibilidad o propagación vegetativa obligada. (García-Águila *et al.*, 2007).

La conservación *in vitro* tiene la ventaja de la disminución de los costos de mantenimiento, facilitar la obtención de plantas libre de patógenos para fines de producción o de investigación, nos permite generar experimentos preliminares frente a estrés para poder realizar selección de accesiones promisorias y la caracterización de estas, y evita la pérdida de variabilidad genética.

Existen diversos trabajos sobre la conservación *in vitro* de *Oxalis tuberosa* Mol., según Muñoz (1988), el medio Murashige y Skoog suplementado con sucrosa 3%, 0.8% de agar y adicionado con ácido abscísico a concentraciones de 5, 10 y 20 mg/L tiene resultados

negativos en la supervivencia de los explantes, puesto que en su experimentación todos sus explantes murieron sin desarrollarse en los tratamientos a probarse, indicando la necesidad de ampliar la investigación en esta área. Otro trabajo de Tapia en 1990, cultivando de 8-10°C con 12 horas luz y 2000 lux, indican que el medio óptimo para la conservación de oca es el Murashige y Skoog, sucrosa 3%, agar 0.8% y adicionado con 40 g/L de sorbitol o también el medio Murashige y Skoog a media fuerza, indicando además que el medio Murashige y Skoog a media fuerza, sucrosa 3% y agar 0.8% sería el mejor, puesto que asegura que no exista ninguna mutación en la planta, recomendando además hacer estudios de estabilidad genética.

En el Perú, el INIA conserva 1827 accesiones de *Oxalis tuberosa* Mol., las cuales son mantenidas en campo en la E.E.A. Andenes en el Cuzco, solo 300 de estas accesiones son conservadas en el banco de germoplasma *in vitro* del INIA. En otros países de Sudamérica se conservan ciertas accesiones de esta especie o su género, en Chile no conservan a esta especie, pero mantienen en semillas de otras especies del género *Oxalis* como *O. megalorrhiza* (2 accesiones), *O. virgosa* (1 accesión), *O. coquimba* (1 accesión), *O. micrantha* (1 accesión), *O. campanensis* (1 accesión) y *O. gigantea* (15 accesiones) (comunicación del Dr. Fernando Ortega, Coordinador de Programas Nacionales de Cultivos y RRGG, INIA, Chile); en Ecuador se conservan 52 accesiones correspondientes a la core collection, mientras que en la Universidad Yachay, Ecuador hay 300 accesiones conservadas en campo (comunicación del Dr. César Tapia, Especialista y Coordinador Nacional de Recursos Fitogenéticos, INIAP, Ecuador), en Argentina se conservaron 12 accesiones mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales (comunicación del MSc. Ariana Digilio, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA, Argentina), y finalmente en Bolivia según la información obtenida del Banco Nacional de Germoplasma de Bolivia del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y

Forestal (INIAF) cuentan con 487 accesiones de la especie, siendo 232 de estas conservadas *in vitro* y como tubérculo.

En el presente trabajo se evaluará diferentes medios de conservación para alargar el periodo entre subcultivos para esta especie en el banco de germoplasma *in vitro* del INIA, haciendo uso de retardantes osmóticos y agentes antioxidantes para lograr esta meta. Posterior a esto, los dos mejores tratamientos serán sembrados en medio de propagación para observar si existe alguna diferencia entre el desarrollo de estos explantes sometidos a diferentes niveles de estrés.

Estos mismos explantes serán regenerados y sembrados posteriormente en macetas en invernadero para realizar la descripción morfológica de acuerdo a los descriptores de IPGRI (IPGRI/CIP, 2001) y un análisis de marcadores moleculares SSRs para la evaluación de la identidad genética entre el material que ha crecido en las condiciones estándar del Centro Internacional de la Papa versus el material que se ha regenerado a partir de los nuevos medios de conservación formulados corroborando así la estabilidad genética entre los tratamientos y el control.

Contar con un medio de conservación a mediano plazo permitirá disminuir el costo del mantenimiento del banco de germoplasma *in vitro* del INIA y otros bancos de germoplasma que conservan accesiones de oca en condiciones *in vitro*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Conservación de Recursos Genéticos

La conservación de la diversidad genética de plantas es de importancia crítica por los beneficios directos que la humanidad puede derivar de la explotación de los cultivos agrícolas y hortícolas mejorados, así como el potencial de desarrollo de nuevas medicinas y otros productos, y por el papel que juegan los taxones vegetales en el funcionamiento de los ecosistemas naturales (Maxted *et al.*, 2002).

Existen dos formas de conservar los recursos genéticos vegetales: *in situ* y *ex situ*, las cuales usándose en conjunto aseguran una correcta conservación de los recursos fitogenéticos. La conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales hace uso de conservación en campos, conservación en bancos de semillas (destinados usualmente para especies de propagación sexual y semillas ortodoxas o semiortodoxas, o en bancos *in vitro* a través de cultivo de tejidos vegetales (García-Águila *et al.*, 2007).

La metodología de conservación *in situ* presenta la característica de conservar los procesos de adaptación y evolución de los cultivos así como de las relaciones recíprocas inter e intra especies, conservan la diversidad a nivel ecosistémico, interespecífico e intraespecífico, se integra a los agricultores a los sistemas de conservación de RR.GG., conservación sostenible de ecosistema y mantiene e incrementa el acceso de los agricultores a los RR.GG. aunque como desventajas tienen que exponen el material genético a la pérdida de diversidad existente en sus chacras o erosión genética, generado usualmente por el constante cambio de hábitos alimenticios, la simplificación de la agricultura a pocas variedades de importancia económica, poco auspicio de los cultivos autóctonos por prejuicios sociales y susceptibilidad a plagas y enfermedades.; mientras que la conservación *ex situ* implica la conservación en colecciones de campo, colecciones *in vitro* de germoplasma y el desarrollo de colecciones fitogenéticas teniendo como

ventajas frente a la conservación *in situ* la disminución de costos, es más seguro frente a plagas o posibles desastres naturales, da facilidades para la caracterización de los bancos de germoplasma y facilitar material para los investigadores, evita la acción de la erosión génica (Jarvis *et al.*,2000; Martínez, 2001; Tapia *et al.*,2004).

2.1.1. Cultivo de Tejidos Vegetales

Los cultivos vegetales son una metodología que tuvo sus inicios en la década de los 30s cuando las ideas de generar cultivos celulares de plantas superiores empezaron a surgir, fue en 1939 cuando Philip White logró mantener el cultivo celular de tejidos indiferenciados denominados callos por un periodo indeterminado de tiempo (White, 1939). Este experimento marcó el inicio del desarrollo del campo de cultivo de tejidos vegetales, que es un pilar fundamental en el desarrollo de la biotecnología vegetal moderna (Seguí, 2016). El cultivo de tejidos vegetales es un cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones *in vitro* físicas y químicas definidas, estas técnicas sirven para estudios básicos de las plantas, modificaciones y mejoramiento de plantas con selección de líneas con características favorables o generadas por diploidización, siembra de anteras entre otras metodologías, para la conservación de germoplasma y generación de plantas libres de patógenos, propagación clonal, formación de productos de las células vegetales como metabolitos, transformación de plantas y edición de genomas, etc. (Thorpe, 2007).

La conservación de germoplasma por medio del cultivo de tejidos ha sido propuesta como una alternativa a la conservación en campo o por banco de semillas, para plantas cuyas semillas son recalcitrantes y de corta viabilidad, plantas que presentan autoincompatibilidad o propagación vegetativa, plantas de alta heterocigocidad y requieren ser clonadas para mantener la integridad genética, además de raíces y tubérculos de corta vida en el proceso de almacenamiento deben ser conservadas

mediante las técnicas de conservación *in vitro* (Henshaw, 1975), presentando además un alto nivel de estabilidad genética por parte de la organogénesis (Murashige y Skoog, 1962).

Existen metodologías que han sido probadas para la conservación de germoplasma entre las que destacan la criopreservación, la tuberización *in vitro* y el método de crecimiento mínimo; la primera metodología si bien ha sido estandarizada para papa, no ha tenido resultados eficientes frente a otras tuberosas andinas como oca, ulluco o mashua; la segunda metodología ha sido investigada adecuadamente generando protocolos para la generación de tuberculillos de oca haciendo uso de grandes dosis de sucrosa (80 g/L) y reactivos debido al constante cambio de medio de cultivo, y siendo una metodología muy extensa debido a que consta de 3 etapas en un periodo de 110 días aproximadamente para su desarrollo sin mencionar que este procedimiento nos facilitará tuberculillos, los cuales posteriormente deberían ser evaluados con respecto a la viabilidad (Pomar, 2002); por último la tercera metodología ha tenido avances en países como Ecuador y Bolivia, pero estos estudios solo dan una evaluación de los medios de conservación en un periodo de tiempo de 12 meses tomándose la disminución del crecimiento longitudinal del explante como el factor importante en la conservación *in vitro*, lo que no necesariamente indique el aumento del tiempo de vida del explante y sin corroborar la identidad genética luego de someter el explante al estrés osmótico y estrés oxidativo (Muñoz *et al.*, 1988; Tapia *et al.*, 1990).

2.1.1.1. Método de crecimiento mínimo

Es una metodología fácil de implementar en un laboratorio de cultivo de tejidos y de un bajo costo, además que no requiere de implementos costosos como el mantenimiento de recipientes con nitrógeno líquido para mantener los tejidos en congelamiento. Para disminuir la velocidad de crecimiento de las plantas *in vitro* es necesario alterar las

condiciones óptimas de crecimiento, para lo cual se hacen variaciones con respecto al contenido de nutrientes del medio (Rayas *et al.*, 2002), disminución de la temperatura, disminución de la intensidad lumínica (Golmirzaie *et al.*, 1999), la adición de agentes osmóticos activos tales como sorbitol o manitol, y/o el uso de fitohormonas que retarden el crecimiento (Espinosa *et al.*, 2002).

Este método se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta, ni se detiene la maquinaria celular (Roca *et al.*, 1994), aunque frente a estos factores de estrés se presenta el oscurecimiento de los tejidos y la defoliación de estos, atribuido a la oxidación fenólica y a la inducción de senescencia.

2.1.1.2. Modificadores Osmóticos Activos

Los modificadores osmóticos activos son sustancias que ayudan a disminuir el potencial hídrico del agua, mediante el aumento de la cantidad de osmolitos en el medio se disminuye la absorción de agua por parte del explante lo que disminuye el turgor celular y genera un estrés hídrico en el explante (Gopal y Iwama, 2007). Otra ruta de acción de estas sustancias es la de ser sustancias no metabolizables, lo que genera una competencia frente a la sucrosa la cual dota de energía inmediata al explante, al intervenir los modificadores osmóticos se disminuye el metabolismo del explante (Bhat y Chandel, 1993; Yaseen, 2013).

2.1.1.3. Agentes Antioxidantes

Los agentes antioxidantes son moléculas con la capacidad de retardar o prevenir la oxidación de ciertos compuestos, en otras palabras controlan la transferencia de electrones de hacia los agentes oxidantes. En las células se producen diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y los radicales libres como el hidroxilo (-OH) y el superóxido (O₂⁻) (Gaspar *et al.*, 2002).

Entre los agentes antioxidantes se encuentran el glutatión, melatonina, tocoferol, carotenoides, polifenoles y el ácido ascórbico. El ácido ascórbico es una molécula necesaria para el desarrollo de plantas y animales, el ácido ascórbico reacciona con diferentes radicales tales como el superóxido, tocoferóxil, alkóxil/peróxil con una tasa constante de $> 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto incluso podría complementar la acción de la superoxidodismutasa para remover los superóxidos in vivo y puede regenerar el tocoferol de los radicales tocoferóxil in vivo (Smirnoff, 2000).

2.1.1.4. Descriptores del Cultivo de Tejidos

Al ser sometidos al cultivo de tejidos, los explantes vegetales no presentan una fisiología normal y esto es generado debido a factores propios de la metodología del cultivo de tejidos: alta humedad del ambiente, baja luminosidad, factores nutricionales como las sales usadas en el medio, los explantes aún no realizan fotosíntesis debido a que no han desarrollado un sistema foliar y dependen de la energía proporcionada por la sucrosa, no hay intercambio gaseoso entre el ambiente y el frasco donde se cultiva el explante, acumulación de metabolitos tóxicos, entre otros factores (López, 1996).

Estos factores alteran el normal desarrollo de los explantes *in vitro*, lo que genera variaciones con respecto a la turgencia, forma, desarrollo y coloración de los tejidos, entre estos se desatacan la clorosis, defoliación, fenolización, necrosis e hiperhidricidad; estos factores interfieren en el normal funcionamiento fisiológico de la planta, como la capacidad de realizar fotosíntesis, la viabilidad de sus tejidos, el funcionamiento de su sistema conductor.

La defoliación es una característica asociada al estrés hídrico generado por el sorbitol, ya que al limitarse el ingreso de agua al tejido vegetal, el turgor de las células disminuye lo que a la larga genera que se empiece a generar ácido ábscísico como respuesta al estrés

y las hojas empiecen a caer del explante (Gopal y Iwama, 2007); la clorosis es una característica asociada a la falta de hierro para poder generar el aminoácido laevulinico y protoporfirinogeno que son precursores de la clorofila; por otra parte la necrosis es una característica observada que usualmente se asocia a la carencia de calcio, puede ser un paso posterior a la hiperhidricidad la cual se cree es generado por una alta cantidad de iones cloruro (Cl⁻) o por alta cantidad de micronutrientes; y por último la fenolización observable como enmarronecimiento del medio es generado por productos del metabolito de la misma planta, o tejidos dañados los cuales secretan sus restos celulares al medio (George *et al.*, 2008), siendo este un factor muy importante en la conservación de *Oxalis tuberosa* Mol. debido a la alta cantidad de compuestos fenólicos que arroja al medio como productos de su metabolismo los cuales puede que generen toxicidad y variaciones en el pH de este.

2.2. Estabilidad Genética

Muchas aberraciones en el cultivo de tejidos vegetales puede generarse por diferentes factores como la habituación o hiperhidricidad, generadas por el estrés oxidativo como el estrés salino (McKersie y Lesheim, 2013), estrés hídrico (Navari-Izzo, *et al.*, 1996), deficiencia de minerales (Elstner, 1991), etc. La influencia de las especies reactivas del oxígeno (ROS) puede resultar en la mutación (Bohr y Dianov, 1999), generando variación a nivel de metilación de DNA, cambios en número de cromosomas, deleciones, sustituciones, etc. (Hagege, 1995). Uno de los mayores problemas relacionados al cultivo de tejidos vegetales es la variación somaclonal surgida en los subclones de las líneas parentales (Gould, 1986).

Contra estos problemas, las técnicas moleculares son poderosas y útiles herramientas usadas en el análisis de la fidelidad genética de plantas mantenidas en condiciones de *in vitro* (Martins *et al.*, 2004). Por lo que el uso de marcadores moleculares como SSR los

cuales ofrecen un enfoque flexible del estudio de genética de poblaciones, mapeo genómico y el screening de mutaciones somáticas (Zietkiewicz *et al.* 1994). A su vez debe ser complementada con análisis de fenotipos y descriptores morfológicos, para el caso de Oca los descriptores morfológicos han sido reportados y estudiados teniendo como resultado un catálogo de descriptores usado para la caracterización de las diferentes accesiones de oca, entre los descriptores que diferencian entre grupos de accesiones se encuentran tubérculos, follaje, tallos, axilas de tallo y flores (IPGRI/CIP. 2001).

2.3. *Oxalis tuberosa* Mol.

Esta especie presenta la siguiente clasificación taxonómica (Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 31 Aug 2020).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Oxalidales Bercht. & J. Presl

Familia: Oxalidaceae R. Brown

Género: *Oxalis* L.

Especie: *Oxalis tuberosa* Mol.

La oca mide entre 20-30 cm. con tejidos suculentos que presentan coloración rojiza y verdosa, sus tubérculos tienen forma ovoide y miden entre 7-11 cm de longitud y con variedad de coloración como blanco, amarillo, rosado, rojo, morado y negro, habita de manera natural en regiones con precipitaciones anuales entre 570-2000 mm y altitudes entre 2800-4000 m.s.n.m. por lo que se encuentra abundantemente en Ecuador, Perú y Bolivia pero puede ser encontrada en Chile, Argentina, Colombia y Venezuela.

Es la segunda tuberosa más importante después de la papa y de suma importancia para la alimentación de las poblaciones indígenas, donde estas las consumen de diversas maneras ya sean cocidas, fritas, en puré, secadas al sol, etc.; esta especie presenta resistencia a bajas temperaturas viéndose una reducción de su crecimiento solo a temperaturas inferiores a 4°C, crecen en suelos pobres con un rango de pH de 5.3-7.8, tiene resistencia a plagas y enfermedades y presentan una mayor y más constante producción de tubérculos comparado con la papa (Seminario, 1988; Flores *et al*, 2002); por otro lado estudios sobre la caracterización nutricional de su tubérculo indica que es igual o mejor que la papa (Popenoe *et al.*, 1989), presenta alta cantidad de antioxidantes en sus tubérculos (Campos *et al.*,2006) y actividad antibacterial debido a la proteína ocatina específica del tubérculo y que se localiza en las células del parénquima de la médula y la peridermis (Flores *et al.*,2002). Con respecto a los valores nutricionales de esta especie, se indica que los tubérculos de esta especie presentan de 3-8.4% de proteínas, de 83-88.8% de carbohidratos, 0.5-0.6% de grasas 1.9-3.5 % de ceniza, 80.2-84.6% de humedad y de 368-374 cal/100g de peso (King y Gershoff, 1987).

Dadas estas características es una planta muy promisoría en la alimentación, pero a nivel comercial es muy poco conocida, por lo que las poblaciones andinas la usan principalmente para consumo propio y muy poco con fines de venta y producción, esta es la principal limitante para su conservación.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Hipótesis Alternativa

Las modificaciones en las concentraciones de componentes osmóticos en el medio de cultivo y el uso de un antioxidante hacen que las plántulas de *Oxalis tuberosa* sobrevivan un periodo mayor a 6 meses sin disminuir la viabilidad de las mismas ni generar variación genética.

Hipótesis Nula

Las modificaciones en las concentraciones de componentes osmóticos en el medio de cultivo y el uso de un antioxidante **no** hacen que las plántulas de *Oxalis tuberosa* sobrevivan un periodo mayor a 6 meses sin disminuir la viabilidad de las mismas ni generar variación genética.

3.2. Objetivos

Objetivo General

Generar un medio de conservación *in vitro* para la especie *Oxalis tuberosa* Mol., haciendo uso de agentes osmóticos y agentes antioxidantes que alarguen el tiempo del vida del explante.

Objetivos específicos

Definir los descriptores para evaluación de conservación *in vitro* de *Oxalis tuberosa* Mol.

Evaluar el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo en los descriptores de evaluación.

Demostrar la capacidad de regeneración de los explantes luego de ser sometidos a los diferentes tratamientos de conservación en cultivo *in vitro*.

Corroborar a nivel morfológico la uniformidad de estos marcadores fenotípicos luego de someter las muestras a los tratamientos de conservación *in vitro*.

Corroborar a nivel genético la uniformidad de estos marcadores SSRs luego de someter las muestras a los tratamientos de conservación *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Las accesiones utilizadas en el experimento para determinación del medio de conservación más adecuado se obtuvieron del Centro Internacional de la Papa (CIP), las cuales han sido mantenidas con una temperatura 7 ± 1 °C, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, la humedad relativa oscilante entre 60-70%, con una iluminación entre 2500-2800 Lux, sembrándose tres explantes en tubos de 25x150 mm con 10 ml de medio de conservación el cual es medio Murashige y Skoog con 20 g/L de sucrosa, 20 g/L de sorbitol, 6 g/L de agar a un pH de 5.6, además de presentar las siguientes características con respecto a estado sanitario, periodo de subcultivo y lugar de colecta (Tabla 1):

Tabla N° 1. Accesiones del Centro Internacional de la Papa usadas en el experimento *in vitro* (Fuente: Centro Internacional de la Papa)

Código	CIP202250	CIP202249	CIP202254	CIP202247
Número de Colecta	MU59	MU55	MU79	MU51
Nombre de accesión	Qantuta	Sawasira	Janq'u luq'i	Janq'u lluchu
Origen	Puno, Perú	Puno, Perú	Puno, Perú	Pasco, Perú
Estatus biológico	Nativo	Nativo	Nativo	Nativo
Estatus de salud del CIP	HS0	HS0	HS0	HS0
Longitud del sitio de colecta	-698.055	-690.988	-693.039	-697.504

Latitud del sitio de colecta	-159.894	-162.616	-163.497	-159.096
Elevación del sitio de colecta	3847	3864	3918	3826
Tiempo de vida en condiciones de CIP(*)	3-5 meses	3-5 meses	3-5 meses	12 meses

El material biológico fue propagado a partir de 2 plántulas madre en medio Murashige y Skoog (1962) con vitaminas y suplementadas con sucrosa a 20 g/L a un pH de 5.6 y gelificado con 6.5 g/L de agar (Anexo 4). Para la propagación se hizo uso de todos los nudos presentes en las plántulas madre debido a la necesidad de conseguir la mayor cantidad de material biológico en el menor tiempo posible, la obtención del material vegetal se realizó mediante 2 propagaciones en medio control para obtener la cantidad requerida para la experimentación (Figura 1).

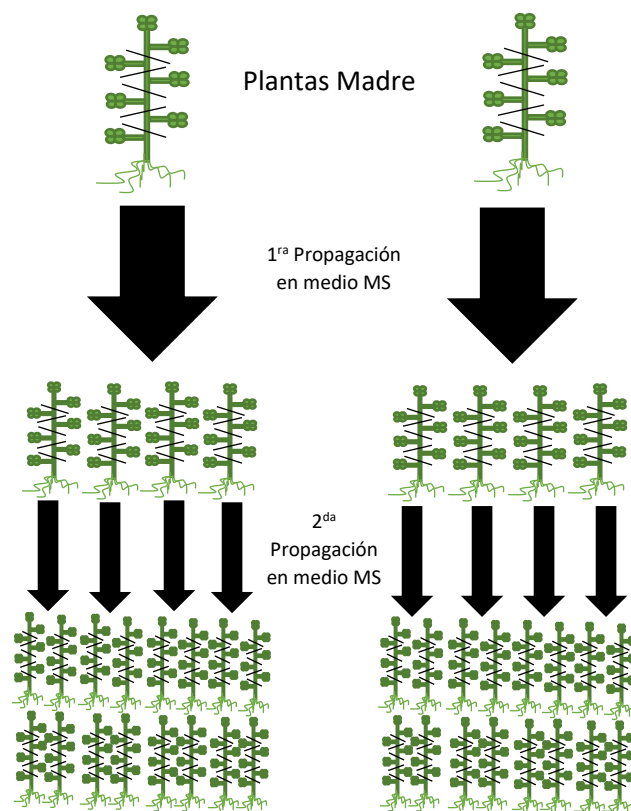


Figura N° 1. Esquema de propagación a partir de las plantas madre (Fuente: Elaborado por Rubén Ferro)

4.2. Medio de Conservación

4.2.1. Tratamientos y siembra

Se evaluaron un total de 12 tratamientos, los cuales presentaban variaciones en los niveles de sucrosa, sorbitol y ácido ascórbico. Estos componentes cumplen una función importante en el cultivo de tejidos vegetales: la sucrosa es la fuente de carbono necesaria en el cultivo de tejidos dado el fenómeno de heterotrofía/mixotrofía de los tejidos cultivados *in vitro*, siendo utilizado para reemplazar el carbón que usualmente es fijado por la fotosíntesis, usualmente es usado en concentraciones de 10-60 g/L; por su parte el sorbitol realizará la función de modificar el potencial osmótico del medio, ya que para las funciones metabólicas en esta especie vegetal es inerte, regulando la absorción del medio

de cultivo por parte de los tejidos subcultivados, también es usado en concentraciones de 10-60 g/L; y el ácido ascórbico trabaja como un agente reductor, es un compuesto hidrofóbico asociado a las membranas y provee defensas frente al daño oxidativo, las concentraciones en las que ha sido usado son desde 1-100 mg/L.

En trabajos con fines de conservación la sucrosa y el sorbitol se usan en el rango de 20-40 g/L, mientras que el ácido ascórbico nunca antes ha sido usado con fines de conservación como en este experimento (Sarkar y Naik, 1998; Golmirzaie y Toledo, 1999).

Todos los medios de cultivo contenían 4.33 g/L de sales del medio Murashige y Skoog (1962) de la empresa Caisson, complementado con las vitaminas descritas para este medio de cultivo (Anexo 4). Las modificaciones con respecto a la concentración de sucrosa, sorbitol y ácido ascórbico en los tratamientos son los siguientes (Tabla 2):

Tabla N° 2. Composición de sucrosa, sorbitol y ácido ascórbico de cada tratamiento

(Fuente: Elaborado por Rubén Ferro)

Tratamientos	Sucrosa (g/L)	Sorbitol (g/L)	Ácido Ascórbico (mg/L)
T1	20	0	0
T2	20	20	0
T3	20	40	0
T4	20	0	100
T5	20	20	100
T6	20	40	100

T7	40	0	0
T8	40	20	0
T9	40	40	0
T10	40	0	100
T11	40	20	100
T12	40	40	100

El pH del medio se ajustó a 5.6, luego se le adicionó agar como gelificante en una concentración de 6.5 g/L, se agregó 10 ml de medio en cada tubo de ensayo de 25x150 mm esterilizándose mediante autoclavado. En los medios que contenían ácido ascórbico, se agregó este reactivo esterilizado mediante filtración al medio preparado y esterilizado mediante autoclave, para su dispensación dentro de cámara de flujo.

El tratamiento T1 corresponde al tratamiento control debido a que presenta los componentes de un medio Murashige y Skoog básico, el resto de tratamientos corresponde a un factorial de 2 concentraciones de sucrosa (2% y 4%), 3 concentraciones de sorbitol (0%, 2% y 4 %) y la presencia o ausencia del ácido ascórbico como antioxidante (0 ppm y 100 ppm).

Para la siembra, se realizó la siembra de 3 yemas del explante de oca por tubo de ensayo, para este procedimiento no hicimos uso de las 2 yemas más apical, ni de las 2 yemas más basales del explante, para descartar la influencia de la concentración de hormonas de los explantes en la respuesta de nuestros tratamientos (Figura 2). De esta forma realizamos la siembra de 12 tratamientos (1 tratamiento control y 11 pruebas) con 12 repeticiones para 4 accesiones diferentes.

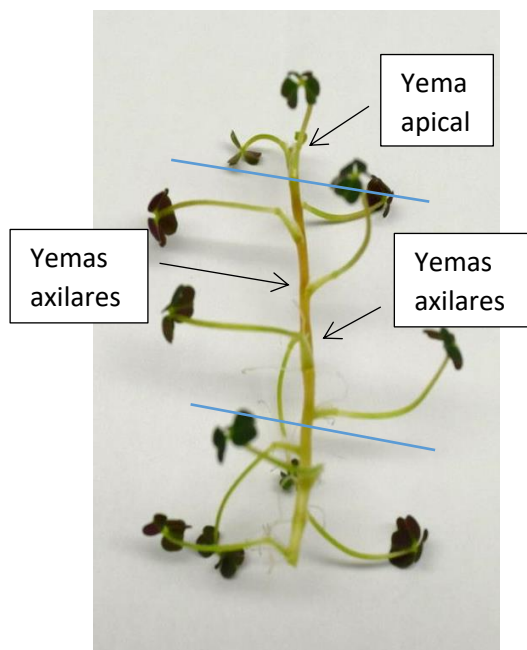


Figura N° 2. Fotografía de un explante de oca y sus explantes (Fuente: Fotografía tomada por Rubén Ferro)

4.2.2. Descriptores para evaluación de los explantes en el medio de conservación

Luego de 15 días de sembrado en la cámara activa que presenta una temperatura de 18-23°C y 2500 lux de iluminación, se procedió a llevar el material a la cámara fría con una temperatura de 11-16°C y 2200 lux de iluminación, en donde se dispuso las 12 repeticiones en 3 bloques compuestos por 4 repeticiones, cada repetición consta de un tubo de 20x150 mm con 10 ml de medio y 3 yemas axilares. La disposición de este material en los tres bloques se muestra a continuación (Figura 3):

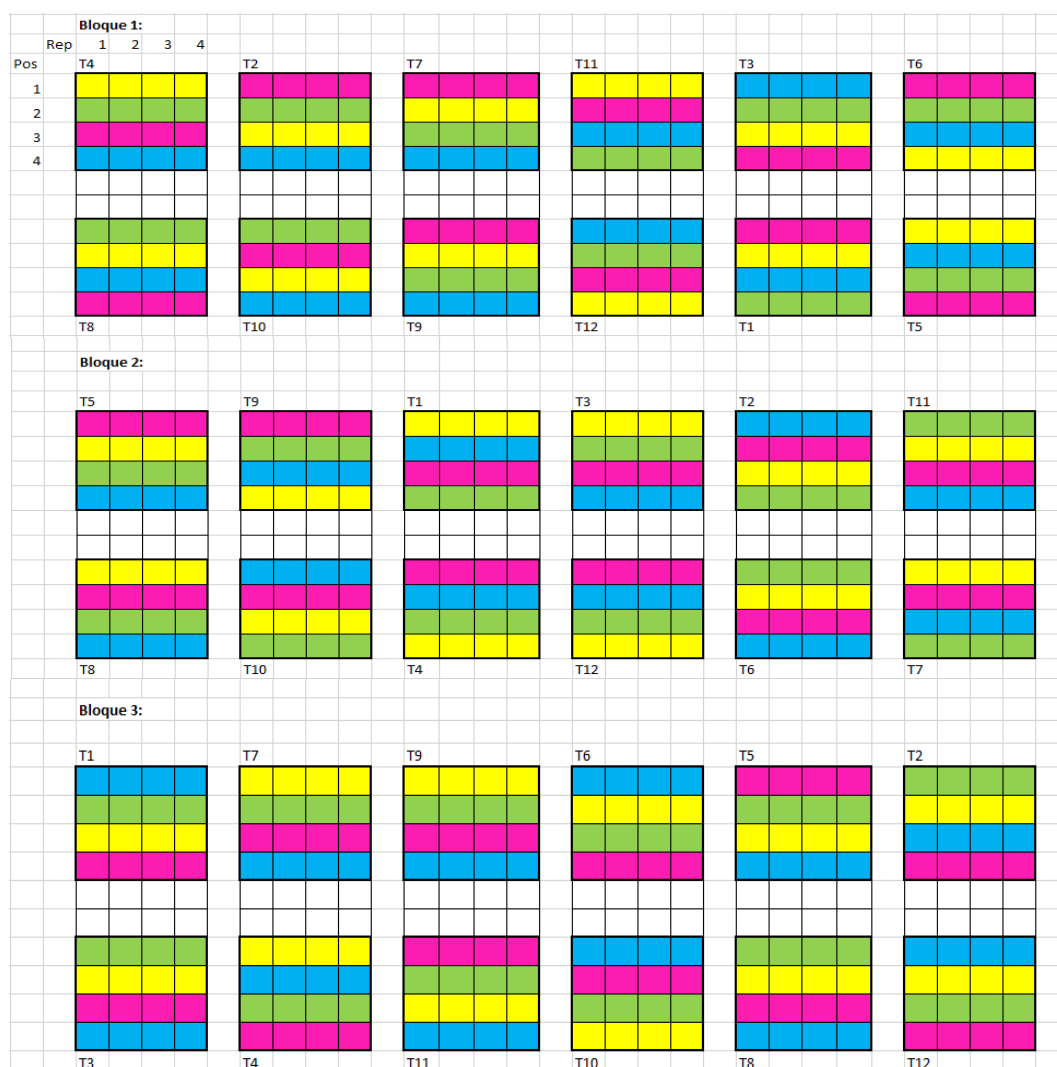


Figura N° 3. Distribución de los bloques del experimento de los medios de conservación ubicados en la cámara fría, los cuadrados color amarillo, cian, magenta y verde corresponden a la accesión MU51, MU55, MU59 y MU79 respectivamente. (Fuente: Elaborado por Rubén Ferro).

La evaluación de los descriptores se realizó para cada repetición (3 explantes en cada tubo de ensayo) de manera mensual. La longitud es una variable que nos sirve como indicador de la velocidad de crecimiento de la planta, se espera que en un medio de

conservación su crecimiento sea lento, la longitud de los explantes fue medida en centímetros y se usó el promedio de los 3 explantes como el valor referencial. El número de nudos es una variable que nos indica la capacidad de multiplicarse de las plántulas en desarrollo y se determinó por conteo directo, usándose al igual el promedio de número de nudos de los 3 explantes.

El resto de descriptores (enraizamiento, necrosis, clorosis, defoliación, fenolización) se midió en forma de dos variables: incidencia de enraizamiento y severidad de enraizamiento, la incidencia se cuantifico en presencia o ausencia de estos descriptores en el tejido del explante usándose 1 o 0 respectivamente, y la severidad se midió en una escala de 1 a 4, siendo el nivel 1 para severidad de 0-25%, el nivel 2 para severidad de 26-50%, el nivel 3 para severidad de 51-75% y el nivel 4 para severidad de 76-100%. Estos descriptores de desarrollo *in vitro*, han sido usualmente reportados como características importantes en diferentes etapas de las metodologías de propagación *in vitro* para diferentes especies, como se explica a continuación:

Necrosis. Observado como tejido sin turgencia ni coloración verdosa, este tejido no presenta viabilidad, es un problema importante en la introducción y micropropagación *in vitro* debido a que los tejidos pueden necrosarse luego del corte o introducción al cultivo de tejidos vegetales volviendo inviable el material biológico, su ausencia se puede tomar como una adecuada respuesta de adaptación al medio de cultivo. En la imagen se aprecia la graduación de necrosis en las muestras de *Oxalis tuberosa* Mol.

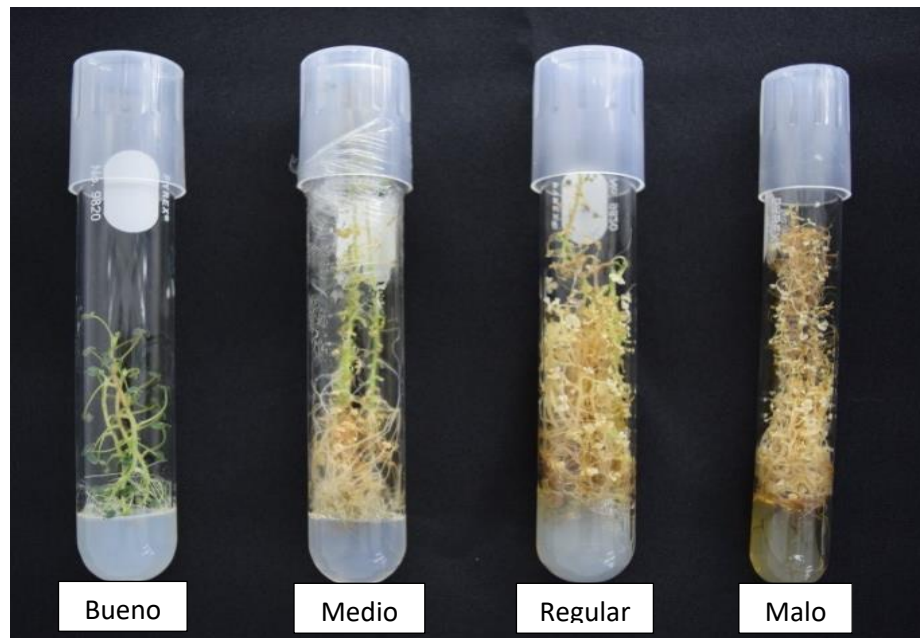


Figura N° 4. Niveles de Necrosis (Crédito: Olegario Robles)

Defoliación. Este descriptor es asociado al estrés hídrico que se genera en los explantes, por lo que por pérdida de líquidos en los tejidos, se empiezan a perder las hojas. En la imagen se puede apreciar los niveles de defoliación desde su ausencia hasta un estado crítico.

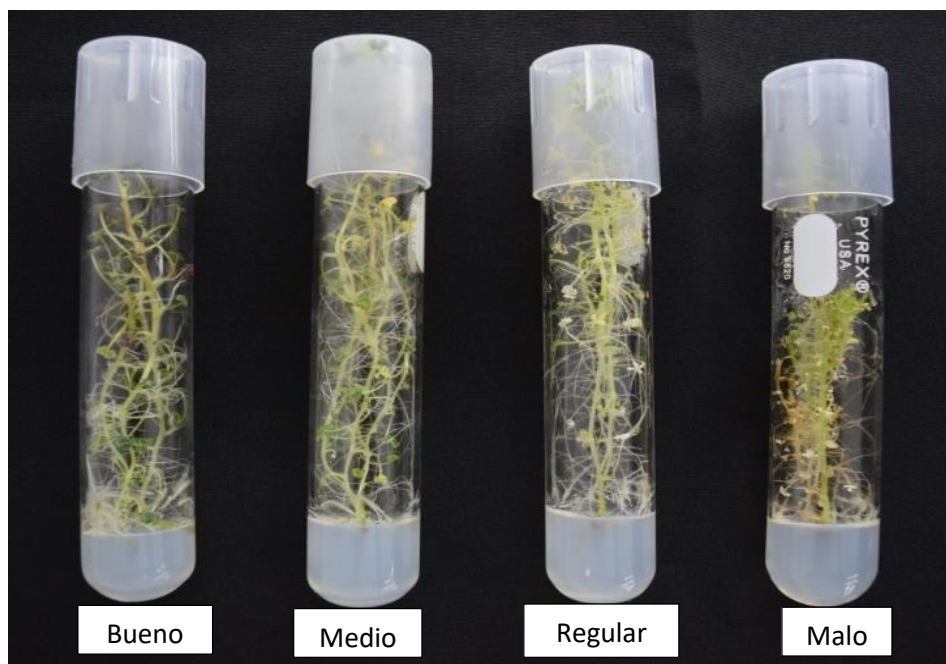


Figura N° 5. Niveles de Defoliación (Crédito: Olegario Robles)

Enraizamiento. El enraizamiento es una fase importante en la micropropagación, debido a que asegura el consumo de nutrientes del medio por parte del explante, debido a que este experimento es con fines de conservación no presenta una etapa propia para el enraizamiento de los explantes, pero su desarrollo es muy importante para la viabilidad de la plántula.

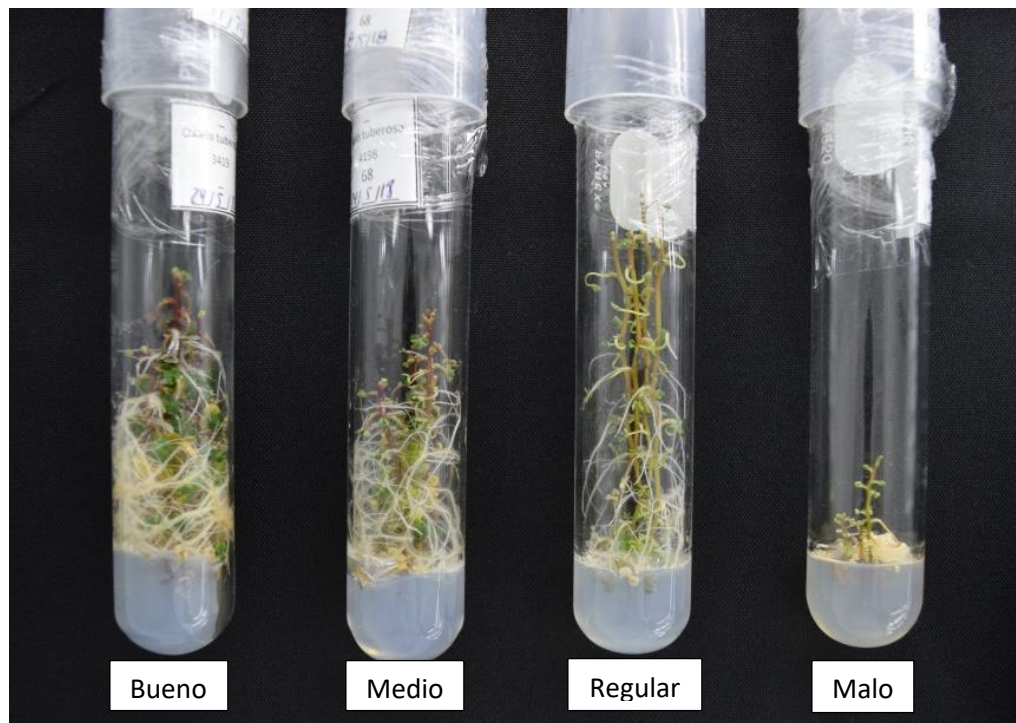


Figura N° 6. Niveles de Enraizamiento (Crédito: Olegario Robles)

Fenolización. Este descriptor nos indicará la presencia de sustancias productos del metabolismo de la planta, que es arrojada en el medio de cultivo y que puede generar toxicidad en la planta y/o variación en el pH del medio lo que dificultaría la absorción de nutrientes por parte del explante.

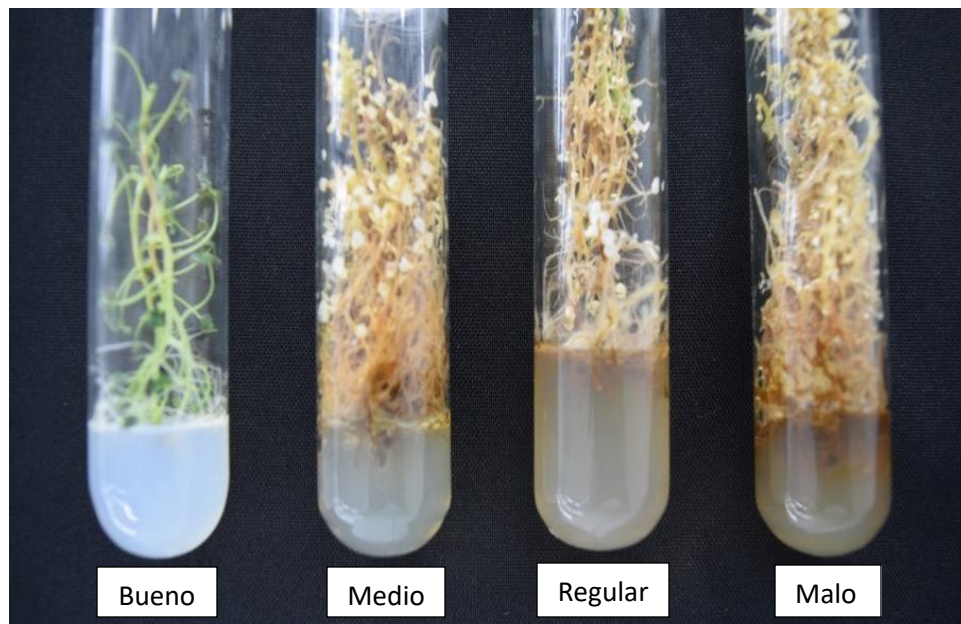


Figura N° 7. Niveles de Fenolización (Crédito: Olegario Robles)

4.3. Regeneración en Medio Control

Para este experimento hicimos uso de 2 tubos de 25x1500 mm con 10 ml de cada uno de los diferentes medios de conservación que se están probando en la experimentación en donde se sembraron 3 yemas axilares, al igual que hicimos en la experimentación del medio de conservación; se sembraron en total 48 tubos correspondientes a 4 accesiones, 12 tratamientos y 2 repeticiones. Luego de un periodo de 8 meses de desarrollo, que comprende 15 días en la cámara activa de 18-23°C de temperatura y 2500 lux de iluminación y 3 meses y medio en la cámara fría de 11-15°C y 2200 lux de iluminación, se procedió a propagar cada uno de las 2 repeticiones de cada tratamiento en 5 tubos de 20x120 mm con 8 ml del tratamiento control, colocándose 2 yemas axilares en cada uno de los tubos y se procedió a mantener en la cámara activa de 18-23°C y 2500 lux de iluminación por un periodo de 1 mes. Luego de este periodo se procedió a evaluar longitud, número de nudos y peso de cada una de las yemas axilares sembradas para

demostrar que es posible la regeneración de los explantes luego de haber sido sometidos a estrés en los diferentes medios de conservación.

Posteriormente se realizó los análisis de normalidad de varianza (ANOVA) entre nuestros distintos tratamientos de origen para saber si existe algún factor que persiste en el tejido a través de las diferentes propagaciones que se realizan y se realizó una prueba a pares de Wilcoxon para poder definir grupos estadísticamente diferentes.

Luego de crecer en los diferentes medios de cultivo de conservación evaluados se procedió a subcultivar los explantes en medio control empleando las mismas condiciones de temperatura e iluminación que los descritos para el experimento de la sección 4.2.1. Los explantes provenientes de todos los medios de conservación pudieron desarrollarse normalmente demostrando que no afectaron la capacidad de regeneración. Las plántulas obtenidas se usaron para evaluar la existencia de modificaciones morfológicas y/o genéticas.

4.4. Caracterización Morfológica del Material Biológico

Para esta experimentación, usamos las plántulas regeneradas en la experimentación anterior en el medio control y mantenidas en desarrollo en la cámara activa por un periodo de un mes. Luego de este tiempo, se sembraron en la E.E.A. Donoso en Huaral, en condiciones de invernadero, para aclimatar se usó vasos de plástico con pequeñas perforaciones que cubrirían las plántulas manteniendo así la humedad y evitando la deshidratación de la muestra durante un mes.

Se utilizaron en total 36 plántulas, 9 plántulas pertenecientes a cada accesión, siendo 3 plantas control enviadas por el CIP y otras 3 plántulas sometidas al tratamiento 11 (T11). Fueron dispuestas en el invernadero en 3 bloques colocados al azar como se muestra posteriormente (Figura 8):

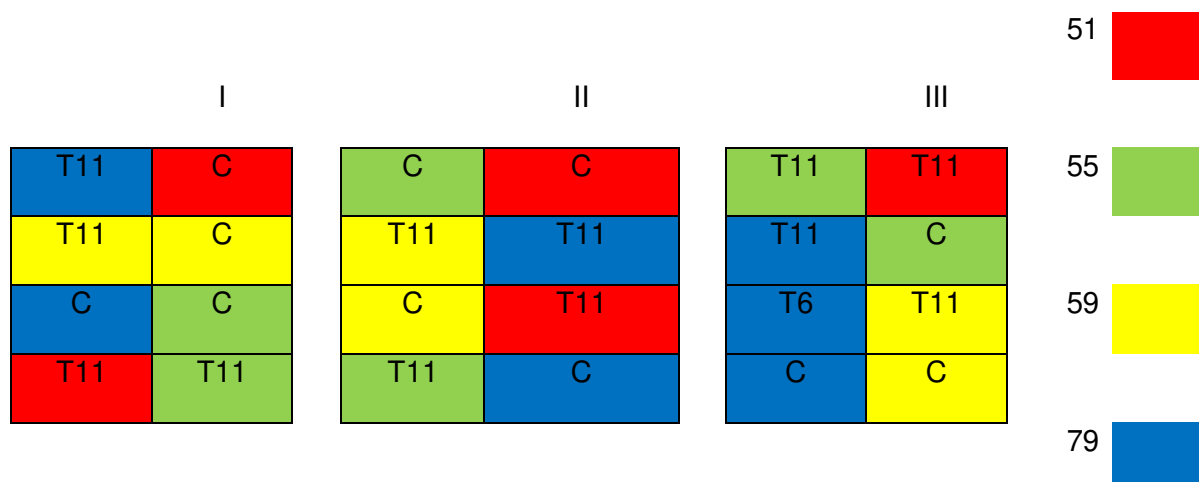


Figura N° 8. Distribución de las macetas en invernadero, 3 bloques distribuidos al azar

(Fuente: Elaborado por Rubén Ferro)

Se utilizaron los descriptores IPGRI para *Oxalis tuberosa* Mol. (IPGRI/CIP 2001) para poder indicar si existen algunas variaciones a nivel fenotípico entre los tratamientos, entre los descriptores IPGRI podemos encontrar características como la coloración de los tallos aéreos, pigmentación de las axilas, color del follaje, color del envés de los folíolos, color del peciolo, etc. haciendo uso de la paleta de colores de Royal Horticultural Society Colour Chart Edition V (Royal Horticultural Society, 2015) para poder ser más objetivos con la evaluación. Tengamos en consideración además que la oca es un cultivar que se desarrolla en climas fríos y en altura, no podíamos darles las condiciones climáticas optimas, por lo que se evaluaron sólo algunos de los marcadores morfológicos que corresponden al desarrollo vegetativo a los largo de 90 días.

Para realizar un agrupamiento de nuestras muestras hicimos uso de una MCA, que será representado en un análisis de agrupamiento de HCPC, el cual nos generará un dendograma de agrupamientos dependientes de las características que presentan cada muestra.

4.5. Caracterización Genética del Material Biológico

Se procedió a coleccionar hojas jóvenes de las ocas que fueron caracterizadas morfológicamente, para lo cual se utilizó el método de extracción CTAB modificado (Doyle y Doyle *et al.*, 1990) (Anexo 8). Posteriormente, se realizó la evaluación de la calidad y cantidad de DNA para proceder a realizar las amplificaciones de 8 juegos de primers. Los primers fueron amplificados cada uno con su propio protocolo de ciclaje y reactivos, además de eso se combinaron 4 pares de iniciadores, cada uno marcado con un diferente fluoróforo para ser analizados en el secuenciador ABI3130XL, que nos indicará los pesos moleculares de los marcadores en las muestras.

Estos datos fueron depurados posteriormente de manera manual y fueron organizados en una tabla para poder ser importados en el programa R (Anexo 10) donde se hizo uso de los paquete *polysat* y *agricolae*, los cuales nos ayudaron a encontrar la distancia genética de las 36 muestras evaluadas, haciendo uso de la distancia genética de Bruvo que toma en consideración las distancias mutacionales entre los alelos pertenecientes a un mismo locus sin necesidad de definir la ploidía del organismo debido a que esta distancia trabaja con promedios de todas las distancias hipotéticas entre los distintos alelos de un individuo hacia otro, la Distancia de Bruvo junto al Índice de Similitud de Intercambio de Banda son los únicos modelos de distancia genética para organismos poliploides (Bruvo *et al.*, 2004), por lo que hemos usado este análisis para poder generar un dendograma de las diferentes muestras con respecto a sus distancias a nivel de marcadores moleculares.

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación de Conservación *in vitro*

Se realizó la evaluación de las plántulas en los diferentes medios de conservación, para ello se midió la longitud y se contabilizó el número de nudos de los 3 explantes sembrados en cada repetición, se anotó como resultado el promedio de estos datos para cada repetición. Luego en el programa R (R Core Team, 2013) usando el paquete “stats”, se analizó la influencia de cada factor para estas variables evaluadas, tomando en consideración que realizamos una prueba a pares de Wilcoxon debido a que los datos no presentaban una distribución normal.

Los resultados obtenidos en relación a la variable longitud del explante, indican que el factor concentración de sucrosa si bien presenta diferencias durante los 3 primeros meses en los que la concentración de 20 g/L tiene mayor longitud, vemos que a partir del cuarto mes hasta acabar la evaluación las diferencias desaparecen; para el factor concentración de sorbitol podemos indicar que hay diferencias significativas entre las 3 concentraciones de sorbitol y el crecimiento longitudinal es inversamente proporcional al aumento del sorbitol en el medio, en el octavo mes vemos que hay una disminución de las diferencias generándose dos grupos (0 y 20 g/L con mayor longitud y 40 g/L con menor longitud); el factor presencia o ausencia de ácido ascórbico no muestra diferencias significativas hasta el tercer mes, donde la presencia de ácido ascórbico a 100 ppm disminuye la longitud promedio de los explantes comparado a los tratamientos que no presentan ácido ascórbico y estas diferencias se mantienen hasta la última evaluación de longitud; y la influencia del factor accesión muestra diferencias significativas desde el primer mes, pero fue en el tercer mes donde se observaron las mayores diferencias entre las longitudes de los explantes, siempre siendo la accesión MU79 el de menor longitud y la accesión MU55 el de mayor longitud (Tabla 3).

Tabla N° 3. Comparación a pares de Wilcoxon de la Longitud del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 10 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Longitud del Explante: Tiempo vs Factores											
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a
	40 g/L	c	c	c	c	c	c	c	b	b	b
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b
Accesión	MU51	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a
	MU55	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a
	MU59	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	b	c	b	b	b	b	b	b	b
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.											

La variable número de nudos nos arroja resultados sobre las diferencias entre los factores luego de realizar la prueba a pares de Wilcoxon, para poder encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. Obtuvimos los siguientes resultados en el número de nudos promedios, el factor concentración de sucrosa presenta diferencias significativas entre sus tratamientos, siendo el tratamiento de 40 g/L que presenta menor cantidad de

nudos hasta el cuarto mes donde las diferencias desaparecen hasta la última fechas de evaluación; el factor concentración de sorbitol en el medio también presenta diferencias significativas graduales entre las concentraciones, siendo el medio con 0 g/L de sorbitol el de mayor número de nudos y el de 40 g/L de sorbitol el de menor número de nudos hasta la última evaluación donde las diferencias desaparecen; el factor ácido ascórbico presenta dos meses sin diferencias significativas (segundo y tercer mes) y a partir del cuarto mes se presentan una diferencia marcada sobre su presencia en 100 ppm y la disminución del número de nudos; el factor accesoión solo presenta diferencias significativas para MU79 indicando que tiene menor número de nudos desde el tercer mes hasta finalizar la evaluación (Tabla 4).

Tabla N° 4. Comparación a pares de Wilcoxon del Número de Nudos del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon del Número de Nudos del Explante: Tiempo vs Factores											
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a
	20 g/L	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a
	40 g/L	c	c	c	c	c	b	b	b	b	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b
Accesión	MU51	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

	MU55	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.											

Además se evaluó diferentes descriptores del desarrollo del explante como enraizamiento, necrosis del explante, defoliación del explante, clorosis de los tejidos y fenolización del medio. Estos descriptores fueron evaluados de 2 formas, la incidencia fue anotada como 1 o 0 dependiendo de la presencia o ausencia de estos descriptores en los explantes o medio de cultivo; luego se evaluó la severidad de cada descriptor en una escala de 1-4, asignando el número 1 para una severidad de 0-25%, 2 para una severidad entre 25%-50%, 3 para una severidad de 50%-75% y 4 para una severidad de 75%-100%.

El análisis de estos datos se realizó usando el programa “R Project” (R Project Core Team, 2013), haciendo uso de dos análisis estadísticos, primero se evaluó la incidencia de cada descriptor haciendo uso de un análisis de desviación (ANODE) para poder evaluar los diferentes modelos lineales que explican de mejor manera nuestros datos, seleccionando un modelo que explique la influencia de los diferentes factores. Posteriormente, realizamos el cálculo de AUDPC para estos descriptores, los cuales fueron analizados en una prueba de Wilcoxon para comparación de pares para encontrar las diferencias significativas entre los diferentes factores de cada medio.

Los resultados de la incidencia del enraizamiento indican que solo existen diferencias significativas los dos primeros meses, para el factor sucrosa notamos que la concentración de 40 g/L presenta mayor enraizamiento que la concentración de 20 g/L; para el factor sorbitol observamos que su ausencia en el medio tiene mayor incidencia de

enraizamiento comparado con la concentración de 40 g/L donde se presenta menor incidencia del enraizamiento; y por último el factor ácido ascórbico mejora el enraizamiento de las plantas generando diferencias significativas los dos primeros meses en cuanto a incidencia del enraizamiento (Tabla 5).

Tabla N° 5. Comparación a pares de Wilcoxon de la Incidencia de Enraizamiento del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Incidencia del Enraizamiento: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Accesión	MU51	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU55	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Los resultados de la severidad del enraizamiento nos indican que existe significancia para 3 factores: la concentración de sucrosa indica que durante toda la experimentación la mayor concentración de sucrosa aumenta el enraizamiento de los explantes en el medio de cultivo; el factor sorbitol genera una disminución del enraizamiento que se muestra de manera gradual dependiendo de la concentración de este compuesto en el medio, hay diferencias entre el medio que no contiene sorbitol y los medios que sí presentan, del cuarto mes hasta finalizar el experimento solo hay diferencias entre el medio de 40 g/L contra los otros medios; y para el factor ácido ascórbico notamos que durante toda la experimentación el medio que contiene ácido ascórbico mejora el enraizamiento (Tabla 6).

Tabla N° 6. Comparación a pares de Wilcoxon de la Severidad de Enraizamiento del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Severidad del Enraizamiento: Tiempo vs Factores																			
Factores	Concentraci ón de Factores	Mes de Evaluación																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Concentraci ón de Sucrosa	20 g/L	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentraci ón de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	b	b	b	c	b	b	a b	b	a b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Concentraci ón de Ácido	0 g/L	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	100 mg/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Ascórbico																		
Accesión	MU51	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU55	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Para la incidencia de la necrosis presenta los si observamos que hay diferencias significativas con los 4 factores: para el factor concentración de sucrosa observamos que del tercer mes al noveno mes hay una diferencia entre los tratamientos siendo el de 40 g/L el que presenta mayor incidencia de necrosis pero luego los tratamientos no presentar diferencias hasta terminar la experimentación; para el factor sorbitol la mayor concentración de sorbitol que es 40 g/L presenta mayor necrosis que el tratamiento con 20 g/L y esto es observable desde el segundo mes, para el caso del sorbitol hay algunos meses donde la ausencia de este compuesto en el medio disminuye la incidencia de necrosis pero no podemos indicar que sea determinante; el factor ácido ascórbico tampoco presenta diferencias significativas por la presencia de este compuesto; y el factor accesión presenta diferencias significativas del quinto al décimo mes donde la accesión MU51 presenta menor incidencia de necrosis y la accesión MU79 presenta mayor incidencia de necrosis (Tabla 7).

Tabla N° 7. Comparación a pares de Wilcoxon de la Incidencia de Necrosis del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Incidencia de Necrosis: Tiempo vs Factores

Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a b	b	b	b	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	a	b	b	b	b	a b	a	a	a	a b	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Accesión	MU51	a	b	b	b	c	c	c	c	c	b	a	a	a	a	a	a	a
	MU55	a	b	b	b	b c	b c	b c	b c	b c	a b	a	a	a	a	a	a	a
	MU59	a	b	b	b	b	b	b	a b	a b	a b	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Para la severidad de la necrosis, debemos indicar que es inversamente proporcional a la concentración de sucrosa y es algo observable desde el segundo mes de evaluación; de la misma forma se puede indicar para la concentración de sorbitol es inversamente proporcional al AUDPC de la necrosis, observándose 2 grupos desde el cuarto mes y 3 grupos diferenciados desde el octavo mes; para el factor ácido ascórbico existen diferencias en los 8 primeros meses indicando que su presencia aumenta la defoliación pero luego no hay diferencias significativas hasta acabar la experimentación; el factor accesión presenta 3 grupos estables desde el tercer mes de experimentación siendo las accesiones MU51 y MU55 los que presentan mayor defoliación y la accesión MU79 el que presenta menor defoliación (Tabla 8).

Tabla N° 8. Comparación a pares de Wilcoxon de la Severidad de Necrosis del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Severidad de Necrosis: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	b	c	b	b	b	c	c	c	c	c	c	c	b	b	b	b	b
	20 g/L	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	40 g/L	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Accesión	MU51	b	d	c	c	c	c	c	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
	MU55	a	c	b	b	b	b	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
	MU59	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Con respecto a la incidencia de clorosis tenemos como resultado que la concentración de 20 g/L tiene menor incidencia de clorosis en algunos meses de la experimentación, para el factor de concentración de sorbitol no existen diferencias entre las concentraciones; el factor ácido ascórbico disminuye la incidencia de ácido ascórbico desde el cuarto mes de experimentación; y el factor accesión muestra diferencias mínimas en el mes 13 donde la accesión MU79 tiene mayor incidencia de clorosis y la accesión MU51 presenta menor incidencia de clorosis en ese mes, pero el resto de toda la experimentación no mostró diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla N° 9. Comparación a pares de Wilcoxon de la Incidencia de Clorosis del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Incidencia de Clorosis: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	b	a	b	b	b	a	a	b	b	b	b	b	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

n de Sorbitol	20 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentració n de Ácido Ascórbico	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Accesión	MU51	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
	MU55	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a b	a	a	a
	MU59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a b	a	a	a
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Para el caso de la severidad de la clorosis, el factor sucrosa en la mayor concentración de sucrosa aumenta la severidad de clorosis, estas diferencias son significativas desde el tercer mes de experimentación; el factor sorbitol presenta diferencias significativas para la concentración de 20 g/L y 40g/L, pero no hay una clara relación de concentración de sorbitol y aumento de este fenómeno en el explante; el factor ácido ascórbico indica que a partir del tercer mes su presencia en el medio disminuye la severidad de la clorosis en los tejidos; y el factor accesión muestra diferencias a partir del tercer mes y se observa que la accesión MU79 presenta mayor severidad de clorosis y el resto de accesiones no muestra diferencias significativas entre ellos para esta característica (Tabla 10).

Tabla N° 10. Comparación a pares de Wilcoxon de la Severidad de Clorosis del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Severidad de Clorosis: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Accesión	MU51	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	MU55	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	MU59	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Para el caso de la incidencia de la defoliación observamos que el factor concentración de sucrosa no presenta diferencias significativas excepto en 2 meses (cuarto y quinto mes) donde la concentración de 20 g/L presenta mayor incidencia de defoliación; para el caso de concentración de sorbitol tenemos resultados similares donde solo se observan

diferencias significativas en su incidencia para el cuarto y quinto mes donde las concentraciones de 20g/L y 40 g/L presentan disminución de la defoliación; el factor concentración de ácido ascórbico no hay diferencias significativas entre la incidencia de esta característica, excepto el periodo del tercer al quinto mes donde la concentración de 0 g/L presenta menor incidencia; y el factor accesión si bien presenta diferencias entre el segundo al cuarto mes, el resto de la experimentación no presentó diferencias significativas relacionadas a incidencia de defoliación (Tabla 11).

Tabla N° 11. Comparación a pares de Wilcoxon de la Incidencia de Defoliación del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Incidencia de Defoliación: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	a	a	a	a b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	b	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Accesión	MU51	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

	MU55	a	b	b	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU59	a	b	a b	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

En los resultados relacionados a la severidad de la defoliación debemos indicar que el factor concentración de sucrosa presenta diferencias significativas indicando que durante todos los meses de la experimentación excepto el segundo mes la concentración de 20 g/L presenta similar incidencia de defoliación comparado con la concentración de 20 g/L; el factor de concentración de sorbitol indica una relación inversamente proporcional con la severidad de defoliación, obteniéndose diferencias significativas entre las concentraciones; para el factor concentración de ácido ascórbico indicamos que aumenta la severidad de la defoliación por los 8 primeros meses luego de este periodo no existieron diferencias significativas hasta terminar la experimentación; y el factor accesión muestra sus diferencias significativas entre siendo la accesión MU79 el que presenta mucha severidad de defoliación y las accesiones MU51 y MU55 presenta menor severidad de la defoliación (Tabla 12).

Tabla N° 12. Comparación a pares de Wilcoxon de la Severidad de Defoliación del Explanter vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Severidad de Defoliación: Tiempo vs Factores		
Factores	Concentraci	Mes de Evaluación

	ón de Factores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Concentración de Sorbitol	0 g/L	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	40 g/L	b	a b	a	b	b	b	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	b	b	b	b	b	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Accesión	MU51	b	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
	MU55	b	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
	MU59	b	a b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																		

Con respecto a la incidencia de la fenolización debemos indicar que los resultados indican que hay diferencias significativas entre el cuarto al quinto mes y del décimo al duodécimo mes de la experimentación donde la concentración de sucrosa aumenta la incidencia de la fenolización, pero el resto de meses no hay diferencias significativas incluso hasta el final de la experimentación; el factor concentración de sorbitol no presenta diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción del cuarto mes donde la concentración

de 40 g/L presenta mayor fenolización que el tratamiento 0 g/L; el factor concentración de ácido ascórbico genera menor incidencia de fenolización durante la mayoría de meses de la experimentación (del cuarto mes al décimo sexto), el resto de meses no hay diferencias significativas; y para el factor accesión presenta diferencias significativas en algunos meses pero al final de la experimentación no hay diferencias significativas (Tabla 13).

Tabla N° 13. Comparación a pares de Wilcoxon de la Incidencia de Fenolización del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Incidencia de Fenolización: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a	a	a	b	b	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	20 g/L	a	a	a	a b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a
Accesión	MU51	a	a	a	a	a	a	a b	a b	a b	a	a	b	b	a	a	a	a
	MU55	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a b	a b	a	a	a	a

	MU59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.

Mientras que el resultado de la severidad de la fenolización, para el factor concentración de sucrosa nos muestra que hay diferencias significativas los once primeros meses donde la concentración de 40 g/L presenta mayor severidad en la fenolización comparado a la concentración de 20 g/L, el resto de meses las diferencias desaparecen hasta acabar la experimentación; el factor sorbitol no presenta claras diferencias en cuanto a una relación de concentración de sorbitol y la severidad de la fenolización; el factor ácido ascórbico muestra diferencias significativas, presentando menor severidad de fenolización los medios que presentan una concentración de ácido ascórbico de 100 mg/L (Tabla 14).

Tabla N° 14. Comparación a pares de Wilcoxon de la Severidad de Fenolización del Explante vs Factores del Medio de Conservación en los 17 meses de evaluación.

Comparación de Wilcoxon de la Severidad de Fenolización: Tiempo vs Factores																		
Factores	Concentración de Factores	Mes de Evaluación																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Concentración de Sucrosa	20 g/L	b	b	b	b	b	b	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Concentración	0 g/L	b	a	b	b	b	b	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a

n de Sorbitol	20 g/L	a	a	b	c	b	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a
	40 g/L	b	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a
Concentració n de Ácido Ascórbico	0 g/L	b	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	100 mg/L	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Accesión	MU51	a	a	b	b	b	b	b	c	c	b	b	b	b	c	d	d	d	d
	MU55	a	a	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	c	c	c	c
	MU59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b
	MU79	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.																			

5.2. Prueba de Supervivencia con los Medios de Conservación

Con el fin de obtener análisis estadísticos con respecto al tiempo de vida que se puede obtener como máximo para cada tratamiento, se realizó una prueba de supervivencia por factores, en los cuales podemos observar si existen diferencias estadísticas significativas en el tiempo máximo de supervivencia del explante.

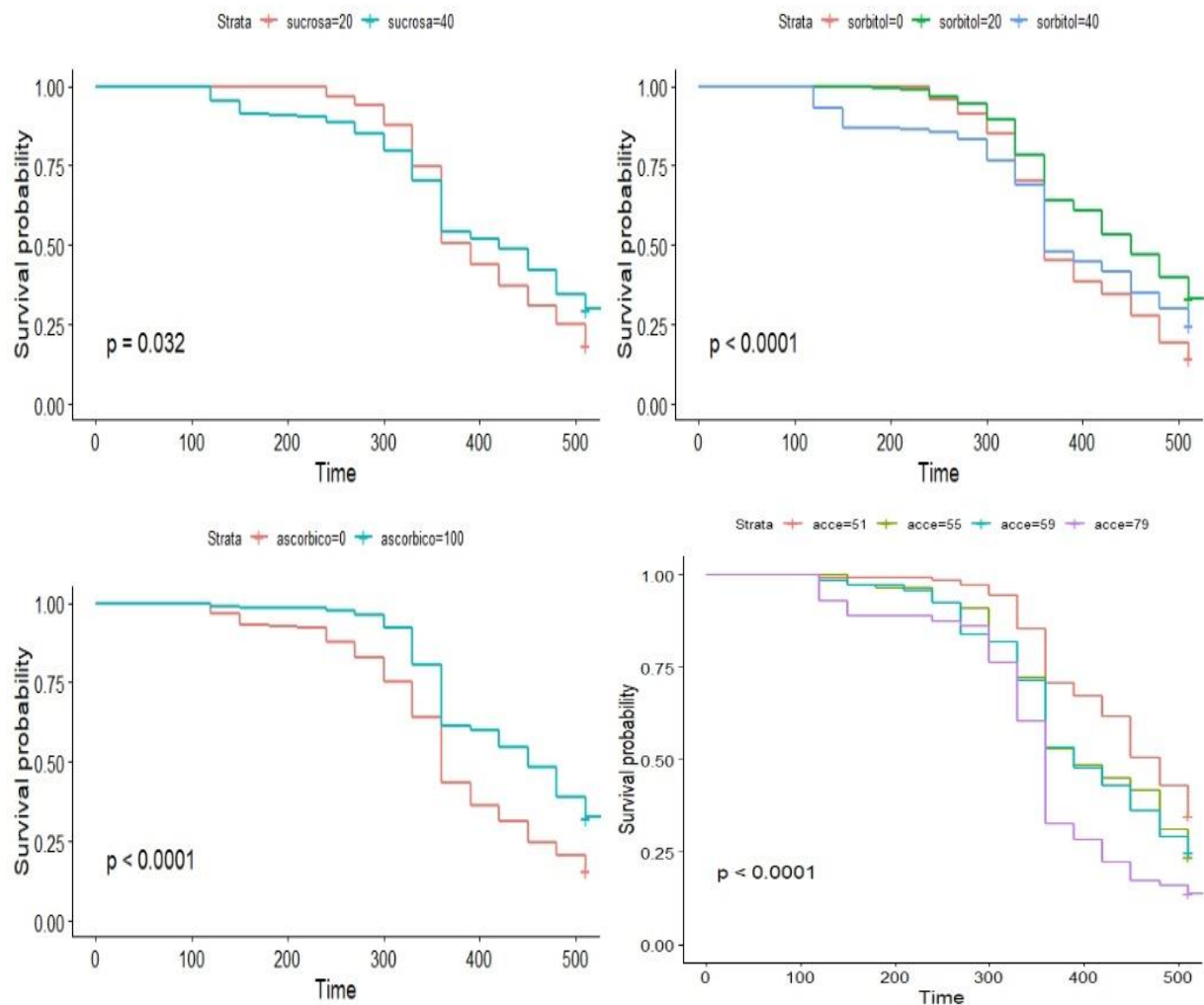


Figura N° 9. a) Prueba de Supervivencia de Concentración de Sucrosa (superior izquierda), b) Prueba de Supervivencia de Concentración de Sorbitol (superior derecha), c) Prueba de Supervivencia de Presencia de Ácido Ascórbico (inferior izquierda) y d) Prueba de Supervivencia de Accesión (inferior derecha)

Como podemos observar en nuestras pruebas de supervivencia, de la Fig. 9 podemos indicar que si bien en los primeros meses se observa que la concentración de sucrosa de 20 g/L mantiene la viabilidad por mayor tiempo notamos que a partir del mes presenta una caída estrepitosa mientras que la concentración de sucrosa de 40 g/L mantiene de

manera más constante la viabilidad, aunque también sufre una caída al mes 11 está es de menor presión comparada con la otra concentración, para el caso de sorbitol observamos que la concentración intermedia de sorbitol correspondiente a 20 g/L mantiene la viabilidad por mayor tiempo mientras que la concentración de 40 g/L tienen una disminución constante de la viabilidad pero luego del mes 11 presenta mejor viabilidad que los tratamientos sin sorbitol. En este análisis se puede apreciar también la buena influencia que se obtiene con agregar ácido ascórbico en el medio, ya que el medio con ácido ascórbico presenta claramente una viabilidad superior. Para el caso de accesiones se corrobora la información previa que nos entregó el Centro Internacional de la Papa (CIP) donde se observa que la accesión 51 tiene una clara viabilidad a lo largo del tiempo comparado con las otras accesiones que según información previa del CIP, éstas presentan una baja viabilidad en el banco de germoplasma *in vitro*.

En el caso de nuestro análisis de supervivencia, debemos considerar que los sesgos existentes en este tipo de análisis corresponden usualmente al tiempo de censura de cada individuo y el posible ingreso de individuos a la experimentación sin encontrarse en las mismas condiciones de tiempo y salud del evento a evaluarse (Rebasa, 2005). Por lo que en nuestro análisis de supervivencia, tratándose de muestras clones de 4 accesiones que han sido mantenidas en condiciones experimentales controladas y habiéndose ingresado a nuestro análisis de supervivencia al mismo tiempo, podemos que nuestros estos sesgos no influenciarán en los resultados obtenidos.

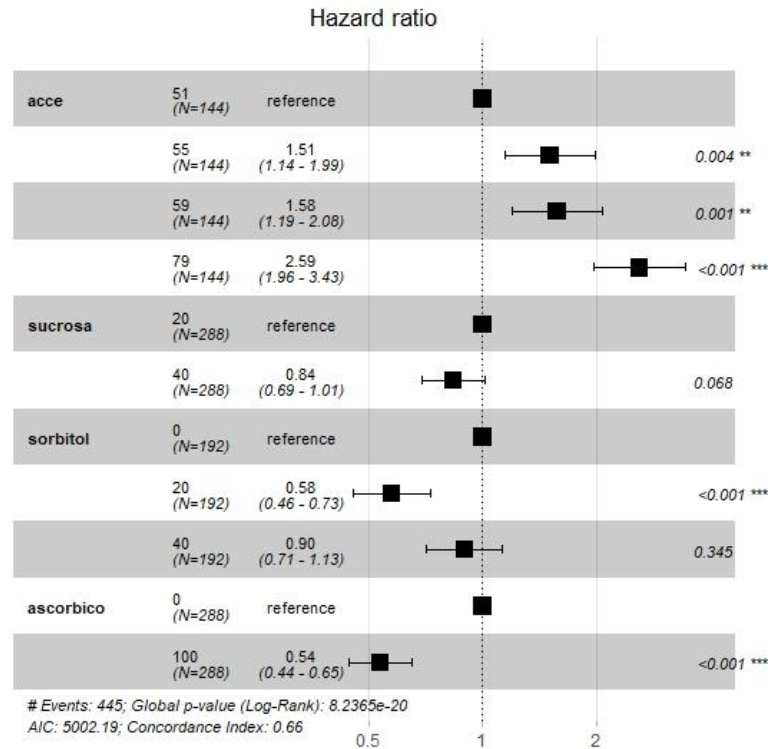


Figura N° 10. Ratio de Riesgos correspondientes a los diferentes factores probados en la experimentación.

Como se puede observar en la Fig. 10, se indica claramente que la combinación de los factores sucrosa a 40 g/L, sorbitol a 20g/L, ácido ascórbico a 100 ppm y la accesión 51 tienen la mejor viabilidad por medio de cultivo de tejidos a lo largo del tiempo, en este presente cuadro se puede observar las diferencias significativas y cuál es la disminución en probabilidad de muerte en cada factor.

5.3. Regeneración en Medio Control

Se utilizaron explantes obtenidos de plántulas crecidas en los medios de conservación probados por un periodo de 8 meses, las cuales fueron propagadas en un medio control y se evaluó la longitud de desarrollo, el número de nudos y el peso del explante, luego de un periodo de un mes en cámara activa con los parámetros indicados anteriormente. Los

datos fueron sometidos a prueba de Wilcoxon por pares, obteniendo como resultado que en el caso de la longitud de los explantes notamos que en los factores concentración de sucrosa y sorbitol no han generado variaciones, para el factor ácido ascórbico observamos que se forman dos grupos relacionado a la presencia o ausencia en el tratamiento de origen siendo mayor para la ausencia (letra a), y para el factor de accesión se observan diferencias, entre la accesión 79 (letra a) y 59 (letra b) hay diferencias claras, pero la accesión 55 (letra ab) que se encuentra entre estas dos no muestra diferencias significativas entre estas dos accesiones, por último la accesión 51 si se diferencia claramente (letra c) (Tabla 15).

Tabla N° 15. a) Prueba de Wilcoxon de Sucrosa vs Longitud (superior izquierda), b) Prueba de Wilcoxon de Sorbitol vs Longitud (superior derecha), c) Prueba de Wilcoxon de Ácido Ascórbico vs Longitud (inferior izquierda) y d) Prueba de Wilcoxon de Accesión vs Longitud (inferior derecha).

Comparación de Wilcoxon para los Resultados de Longitud obtenidos en Medio Control

Factores	Concentración de Factores	Evaluación
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a
	40 g/L	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a
	20 g/L	a
	40 g/L	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	a
	100 mg/L	b
Accesión	MU51	c

	MU55	ab
	MU59	b
	MU79	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.		

Para los datos correspondientes al número de nudos evaluados mediante la prueba de Wilcoxon podemos observar que el factor concentración de sucrosa en el tratamiento de origen no muestra diferencias significativas, mientras que la concentración de sorbitol del tratamiento de origen nos genera dos grupos definidos pero que no están relacionados a un aumento de la concentración, siendo la concentración de 20 g/L (letra a) mayor a las de 0 y 40 g/L (letra b); para la presencia de ácido ascórbico también hay una clara diferencia siendo la presencia de ácido ascórbico la que genera mayor número de nudos y por otra parte el factor accesión presenta claramente tres agrupamientos para las 4 accesiones, las accesiones 79 y 59 no presentan diferencias significativas (letra c) y son las que menor nudos presentan, la accesión 55 presenta mayor número de nudos (letra a) y la accesión 51 se ubica entre los dos grupos antes mencionados (letra b) (Tabla 16).

Tabla N° 16. a) Prueba de Wilcoxon de Sucrosa vs Número de Nudos (superior izquierda), b) Prueba de Wilcoxon de Sorbitol vs Número de Nudos (superior derecha), c) Prueba de Wilcoxon de Ácido Ascórbico vs Número de Nudos (inferior izquierda) y d) Prueba de Wilcoxon de Accesión vs Número de Nudos (inferior derecha).

Comparación de Wilcoxon para los Resultados de Número de Nudos obtenidos en

Medio Control

Factores	Concentración de	Evaluación
----------	------------------	------------

	Factores	
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a
	40 g/L	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	a
	20 g/L	a
	40 g/L	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	b
	100 mg/L	a
Accesión	MU51	b
	MU55	a
	MU59	c
	MU79	bc
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.		

Para la prueba de Wilcoxon correspondiente al peso, el factor concentración de sucrosa del tratamiento de origen y la presencia de ácido ascórbico no muestran diferencias para agrupar los datos, mientras que en el caso de sorbitol podemos observar que hay diferencias significativas y que la concentración de sorbitol es directamente proporcional al peso, para el factor accesión se observan dos grupos diferentes, en el primero con la letra "a" se encuentran las accesiones 55 y 79 siendo mayores al segundo grupo con letra "b" donde se ubican las accesiones 59 y 51 (Tabla 17).

Tabla N° 17. a) Prueba de Wilcoxon de Sucrosa vs Peso (superior izquierda), b) Prueba de Wilcoxon de Sorbitol vs Peso (superior derecha), c) Prueba de Wilcoxon de Ácido

Ascórbico vs Peso (inferior izquierda) y d) Prueba de Wilcoxon de Accesión vs Peso (inferior derecha).

Comparación de Wilcoxon para los Resultados de Pesos de Explantes obtenidos en Medio Control

Factores	Concentración de Factores	Evaluación
Concentración de Sucrosa	20 g/L	a
	40 g/L	a
Concentración de Sorbitol	0 g/L	b
	20 g/L	ab
	40 g/L	a
Concentración de Ácido Ascórbico	0 g/L	a
	100 mg/L	a
Accesión	MU51	b
	MU55	a
	MU59	b
	MU79	a
Prueba a pares de Wilcoxon para comparar tratamientos, anotados de mayor a menor como "a", "b", "c", etc correspondientemente.		

5.4. Caracterización Morfológica del Material Biológico

A nivel morfológico se realizó la evaluación de los descriptores para oca indicados por IPGRI/CIP en el 2001, el análisis elegido para realizar el análisis de nuestros datos fue un Análisis de Correspondencia Múltiple, con estos datos se realizó un dendograma de agrupamiento de HCPC (Agrupamiento Jerárquico de los Componentes Principales)

obtuvieron agrupamientos relacionados a los descriptores obtenidos en las evaluaciones morfológicas.

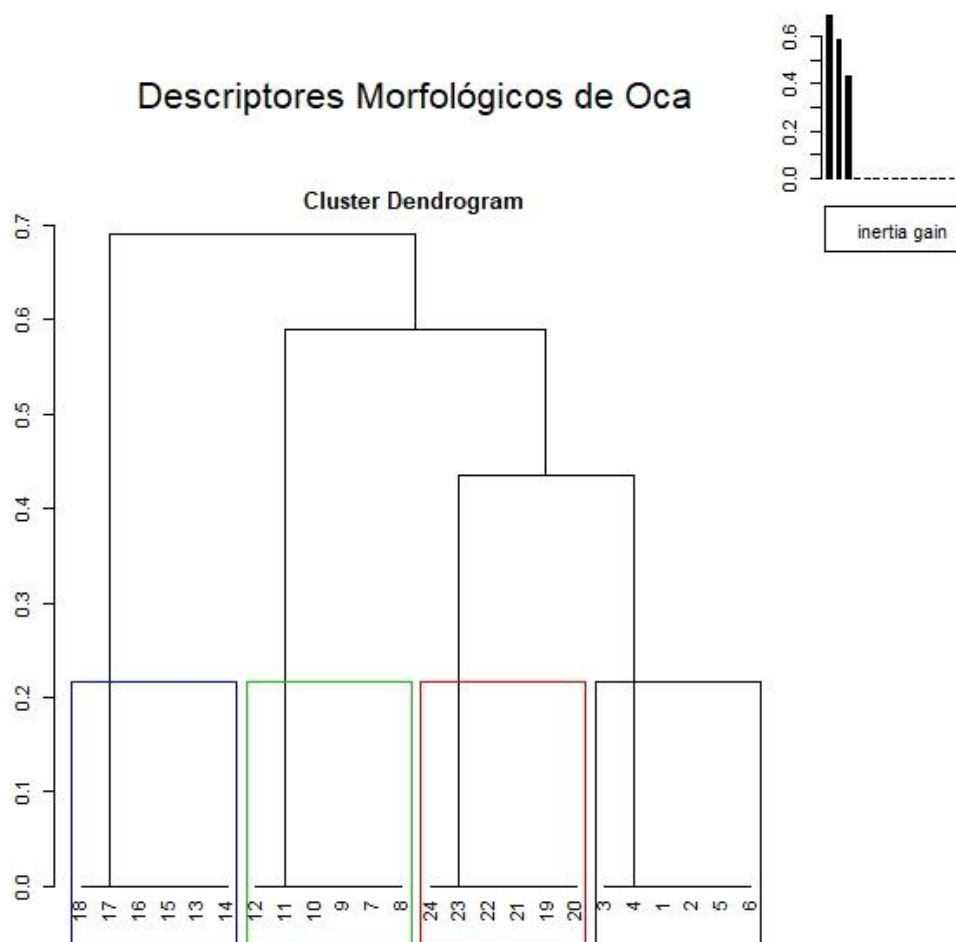


Figura N° 11. Análisis HCPC de los 24 individuos de 4 accesiones diferentes

En la Fig. 11 podemos observar que cada individuo de una misma accesión se encuentra agrupado sin importar el tratamiento de origen, y también tomando en consideración que para los agrupamientos hemos elegido una probabilidad de 0.05, podemos indicar que no hay distancias generadas entre diferentes accesiones, mantienen las mismas características entre las planta provenientes de la misma accesión, es decir se mantiene la integridad fenotípica entre diferentes tratamientos a los que son sometidas las diferentes accesiones.

Entre los caracteres que más contribuyeron en la diferenciación de las accesiones observamos que para la dimensión uno, los más influyentes son: color secundario del tallo, distribución del color secundario del tallo y altura de la planta, mientras que para la dimensión 2, los caracteres más influyentes fueron: pigmentación de axilas y forma de tubérculos.

5.5. Caracterización Molecular del Material Biológico

A nivel de marcadores moleculares, se realizó la prueba de 8 microsatélites (SSR) para evaluar si estos marcadores moleculares no han variado entre los individuos clonales luego de ser sometidos a los tratamientos de conservación. Se realizó la curación de los datos obtenidos por el secuenciador de forma manual debido a que estos protocolos aún se encuentran en una etapa de estandarización, posterior a esto se realizó el análisis con los paquetes “polysat” (Clark, 2019) y “agricolae” (De Mendiburu y De Mendiburu, 2020) en el programa R obteniéndose los siguientes resultados:

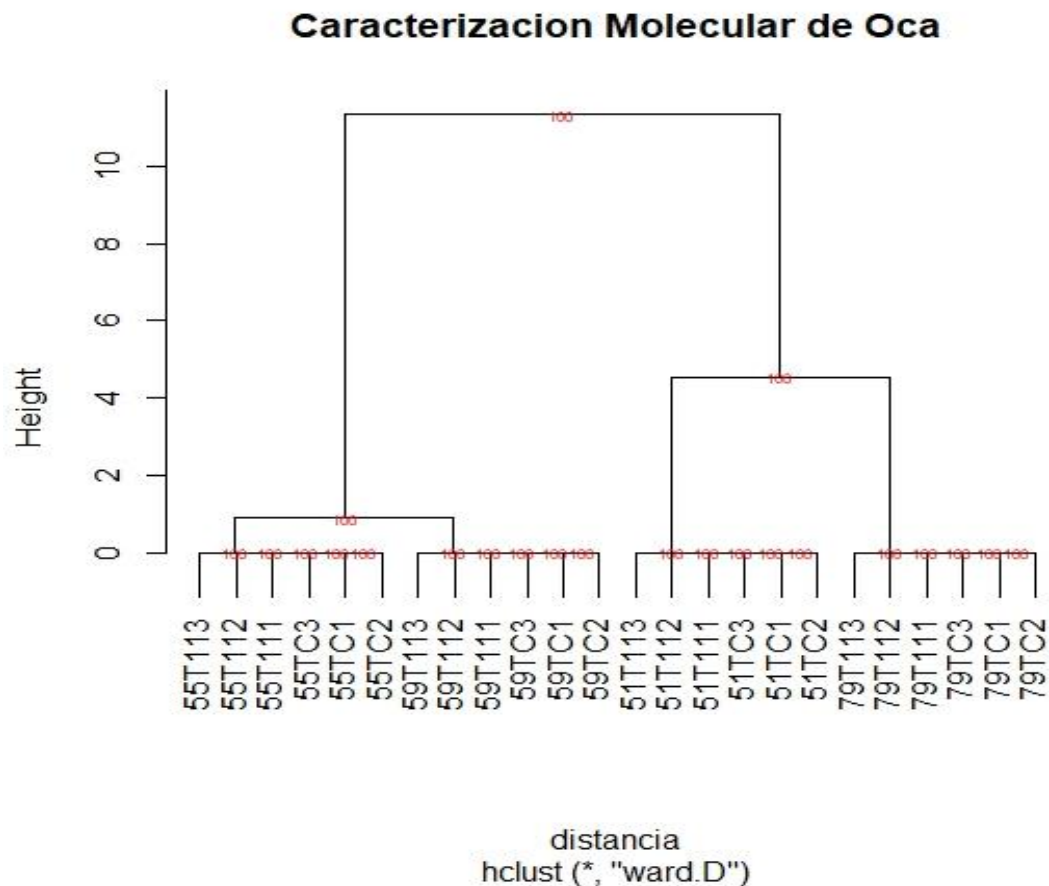


Figura N° 12. Análisis de Clustering de los 24 individuos de 4 accesiones diferentes

Entre nuestros resultados observados en la Fig. 12, podemos notar claramente que todas las accesiones (51, 55, 59 y 79) asignan a todas las muestras obtenidas de la misma accesión pero de diferentes tratamientos como clones, esto debido a que no existen diferencias entre los marcadores moleculares obtenidos a partir de los 8 primers SSRs. Lo que nos indica que por parte del tratamiento de conservación *in vitro* no se generan variaciones entre los marcadores que usamos.

6. DISCUSIÓN

6.1. Medios de conservación más adecuado

El medio de conservación ha presentado diferentes resultados con respecto a la influencia de cada factor del medio en los diferentes parámetros evaluados del explante. Centrándonos en el factor concentraciones de sucrosa, podemos indicar que la longitud disminuye en relación al aumento de concentración de sucrosa por lo que la concentración de sucrosa de 40 g/L tiene menor longitud en los 3 primeros meses de la experimentación, estos resultados son generados por el estrés osmótico que genera las altas concentraciones de sucrosa (Grout, 1991; Withers, 1991), pero estas diferencias desaparecen luego del tercer mes, debido al consumo de la sucrosa del medio de cultivo para este periodo de tiempo, algunos trabajos indican que luego de 28 días de siembra para especies de los géneros como *Hemerocallis* o *Dephinium* se consume entre 20-30 % de un medio de 3-4% de sucrosa (Lumsden *et al.*, 1990). Estas modificaciones del potencial osmótico a su vez afectan rasgos como la disminución del número de nudos en los medios con 40 g/L de sucrosa por los mismos meses en donde hay diferencias de la longitud, un resultado de la diferencia en la longitud tomando en consideración que las distancias internodales han variado pero no de manera significativa para generar estas diferencias. Por otro lado el enraizamiento es mayor en los medios con 40 g/L de sucrosa, debido a la generación de energía inmediata para el explante y aunque modifica el potencial osmótico a nivel de longitud del explante puede que induzca el desarrollo de las raíces, resultados similares se han obtenido en especies como nuez y esparrago (Chenevard *et al.*, 1995; Conner y Falloon, 1993); la necrosis a su vez también ha sido superior en el medio con 40 g/L de sucrosa, tomando en consideración que los explantes, luego de una larga experimentación sufren de escasez de nutrientes y sucrosa en el medio, los explantes en los medios de 40 g/L de sucrosa deben haber sido más

propensos a esta escasez considerando su sistema radicular más desarrollado y una posible habituación a las altas concentraciones de sucrosa; la clorosis también es mayor en los medios que presentan 40 g/L de sucrosa, estudios indican que el nivel de sucrosa normalmente usado con fines de medios de propagación en cultivo de tejidos puede inhibir la síntesis de clorofila (Edelman y Hanson, 1972), pero el grado de inhibición va depender de la especie con la que se trabaja, además que las altas concentraciones de sucrosa no han generado la necesidad de formación de cloroplastos debido a la obtención de energía a partir de la sucrosa del medio, además de la falta de intercambio gaseoso en el frasco para poder inducir la fotosíntesis en el explante; la defoliación también es mayor en los medios con 40 g/L de sucrosa y esto es observable desde los primeros meses de siembra y claramente diferenciables hasta terminar la experimentación, la defoliación es un fenómeno muy relacionado al estrés hídrico de la planta, obviamente la acción de modificación del potencial osmótico en el medio con mayor concentración de sucrosa debe mostrar mayores índices de defoliación; y la fenolización del medio es mayor en los medios con 40 g/L de sucrosa, trabajos realizados en remolacha indican que existe una relación entre la alta concentración de sucrosa y mayor concentración de exudados fenólicos en el medio (Yildiz *et al.*, 2007).

El sorbitol es otro factor que muestra influencia en los resultados, teniendo en consideración que el sorbitol es inerte en el metabolismo de esta especie y su función como modificador del potencial osmótico del medio que tiene como resultado la pérdida de agua y decrecimiento de potencial de agua de las células, generando una acumulación de altos niveles de prolina (Rare, 1990). Los resultados de la longitud del explante muestra una relación inversa entre la longitud del explante y la concentración del reactivo en el medio; con relación al número de nudos también existe una diferencia notable teniendo en consideración que la variación en la longitud intermodal no ha sido

significativa; los resultados relacionados al enraizamiento muestran diferencias notables hasta el cuarto mes de experimentación lo que es causado por la función de modificador osmótico del sorbitol, dificultando que la planta pueda absorber con facilidad los nutrientes del medio y a diferencia de la sucrosa, no otorga energía inmediata para la adaptación al estrés osmótico con el desarrollo de sus raíces; existe una mayor severidad de necrosis en los explantes con 40 g/L de sorbitol mientras que los medios con 20 g/L y 0 g/L de este reactivo muestran menor severidad de la necrosis y no presentan diferencia significativas entre esto dos tratamientos, por lo podemos indicar que las accesiones de oca usados pueden adaptarse al estrés osmótico de 20 g/L sin ningún problema pero al aumentar más el sorbitol se llega a un punto de difícil adaptación por parte de los explantes; los resultados de la clorosis no presenta diferencias significativas debido a la no intervención del sorbitol en las rutas metabólicas de los cloroplastos que fundamentalmente se basa en el consumo de iones de hierro del medio; por otra parte la defoliación muestra diferencias significativas por la concentración de sorbitol, mostrando mayor defoliación en los medios con menor estrés osmótico, lo que podría ser contradictorio tomando en consideración que la acción del sorbitol es generar estrés hídrico en la planta, a su vez disminuye la actividad de la vía de citocromo, en favor de un sistema oxidasa alternativa (De Klerk-Kiebert y Van der Plas, 1985) y favorece el aumento de ácido abscísico tanto *in vitro* como *extra vitrum* (Riera *et al.*, 2005) lo que es una causa de la defoliación, pero las diferencias son notables a partir del cuarto mes de experimentación donde la acción del sorbitol podría haber dosificado el consumo de nutrientes de parte de la planta, haciendo que los meses posteriores la planta pueda presentar mejor vigor comparado al medio sin sorbitol donde puede que el explante ya se encuentre en un periodo de desnutrición o carencia de nutrientes por parte del medio; y para finalizar con la fenolización no se observan diferencias graduales entre la concentración de sorbitol en el medio y un aumento de la fenolización de este.

El ácido ascórbico es el tercer factor que ha influido en los resultados, el ácido ascórbico ha disminuido la longitud de los explantes aunque otros trabajos registran la influencia de este en la división celular y elongación para especies como tabaco y karaya (De Pinto *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2008), a su vez en concentraciones de $4-8 \times 10^{-4}$ M mejora la formación de brotes en callos de tabaco jóvenes y viejos cumpliendo un papel hormonal (Joy *et al.*, 1988), los resultados aquí obtenidos son contradictorios con la bibliografía, lo que podría ser un sesgo del análisis estadístico causado por la mayor supervivencia de explantes sometidos al estrés osmótico en los medios que presentan ácido ascórbico; por parte de los resultados del número de nudos podemos indicar otra vez que es causado por la disminución de longitud explicada anteriormente debido a la no variación de la distancia internodal; los resultados correspondiente al enraizamiento de los explantes indican que el ácido ascórbico influye en el desarrollo de las raíces lo que es respaldado por las investigaciones realizadas en *Pisum sativum* y *Allium cepa* donde indican que para la primera especie una concentración de 50 mg/L mejora el enraizamiento y para el segundo caso aumenta el crecimiento de las raíces después de semanas de experimentación (Bonner y Axtman, 1937; Liso *et al.*, 1988); para los resultados de la necrosis podemos indicar que la acción del ácido ascórbico disminuye la necrosis debido a que es una vitamina que se asocia a las membranas en defensa del daño oxidativo que se ha generado por la escasez de nutrientes en el medio; los resultados de la clorosis indican que el ácido ascórbico presenta menor severidad de clorosis lo que es respaldado por su accionar en la formación de clorofila en callos en una concentración de 10 mg/L (Fukami y Hildebrandt, 1967); los resultados de defoliación indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos debido a que no modifica el potencial osmótico, sino que ayuda a proteger al tejido de los daños generados por este; para finalizar los resultados de la fenolización indican que disminuye con la adición de ácido ascórbico al medio, las plántulas adultas a veces producen sustancias fenólicas que

oscurecen el medio al ser oxidadas las cuales pueden ser autotoxicas o matar al explante (Van Sambeek *et al.*, 1997), el ácido ascórbico al igual que el glutatión y otros antioxidantes, disminuyen la actividad de los compuestos oxidados en el medio (Thompson *et al.*, 1987).

El último factor corresponde a las acciones presentes en los tratamientos, lo cual solo debemos indicar que como bien se conoce, cualquier sistema de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es genotipo-dependiente, por lo que debemos indicar que cualquier diferencia significativa en nuestros resultados es el reflejo de la genética propia de cada individuo. Aunque podríamos indicar que también existen factores epigenómicos correspondientes al momento y situación de los explantes al iniciar la experimentación (Quadrana y Colot, 2016) por lo que debemos considerar que las plántulas al momento de iniciar la colocación en el medio de conservación deben encontrarse vigorosas y en la fase de crecimiento exponencial, asegurando buenos resultados al ser introducidos en el medio de conservación que conlleva a un estrés tan alto que a un explante envejecido podría matarlo.

De acuerdo a los resultados de la prueba de supervivencia hay diversos factores que influyen en el tiempo de vida de los explantes sometidos al estrés osmótico, el primer factor importante es la concentración del sorbitol, investigaciones anteriores indican que el sorbitol cumple la función de disminuir el potencial osmótico del medio (Hammond *et al.*, 2019; Sánchez y Jiménez, 2010; Bhat y Chandel, 1993), lo que dificulta la absorción de sustancias por parte del explante; a una concentración de 2% y 4% de sorbitol en el medio el potencial osmótico del medio baja en -1.00 y -1.56 MPa respectivamente (Gopal y Ywama, 2007). En esta situación el explante propagado presenta estrés hídrico por la presencia de sorbitol que dificulta la absorción del medio (Aazami *et al.*, 2010), también estará sujeto a un estrés por temperatura debido a su crecimiento en la cámara fría de

15°C, a su vez se encontrará en un estrés nutricional debido al consumo de los compuestos del medio con el que fue sembrado y el largo periodo sin propagar. Según nuestros resultados una concentración de 2% de sorbitol en el medio mantiene mejor viabilidad a largo plazo de nuestros explantes, si bien la presión del potencial osmótico es menor comparada con la concentración de 4% de sorbitol, podemos indicar que la presión osmótica de 4% de sorbitol fue demasiada para las plántulas generando tanto estrés en los explantes que los dañó severamente, además que el sorbitol es un reactivo que reacciona con el ácido bórico presente en el medio formando un complejo muy estable que arresta los iones de boro para la planta (Greenwood, 1962), lo que genera el aumento en tiempo de vida de las auxinas y evita la translocación de estas en los tejidos (Goldbach y Amberger, 1986).

El segundo factor importante es la presencia de ácido ascórbico en el medio, como hemos mencionado anteriormente es un antioxidante natural que se ubica en altas concentraciones en las plantas como 23.4 g/100 g de clorofila (Foyer *et al.*, 1983), interviene en la división celular y en la elongación (De Pinto *et al.*, 1999). Los explantes al ser expuestos a estos tratamientos generan diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) que puedan dañar al explante por peroxidación lipídica y oxidación de ácidos nucleicos y proteínas (Fritsche-Neto y Borém, 2012), además que la presencia de los ROS en el medio genera toxicidad y varía el pH del medio interfiriendo con el tiempo de viabilidad de los explantes. Nuestros resultados indican que el ácido ascórbico como agente antioxidante aumenta el tiempo de vida de los explantes y ayuda a resistir los altos niveles de ROS generados por el estrés al que han sido expuestos, además que interviene en la formación de oxalatos (Smirnoff, 2000) que a su vez funcionan como osmolitos para contrarrestar el bajo potencial osmótico del medio y contrarrestar el estrés hídrico (Velarde, 2009).

El tercer factor a tener en consideración corresponde a la concentración de sucrosa en el medio, los resultados indican que la concentración de sucrosa en 40g/L mantiene por mayor tiempo la viabilidad de los explantes comparado a la concentración de 20 g/L de sucrosa. La sucrosa absorbida es descompuesta en sus azúcares constituyentes por el metabolismo del explante al menos en un 50% (Helgeson *et al.*, 1972). Para algunas especies de los géneros *Hemerocallis* y *Delphinium* cultivadas en medio con 30-40 g/L de sucrosa, consumen del 20 al 30% de la sucrosa en 28 días (Lumsden *et al.*, 1990), ahora teniendo en cuenta el aumento del potencial osmótico en el medio por parte del sorbitol, debe disminuir considerablemente el consumo de sucrosa por parte de los explantes; de esta manera el sorbitol funciona como un dosificador que permita disponibilidad de sucrosa en el medio para energía inmediata del explante por un amplio periodo de tiempo comparado a la disponibilidad de sucrosa en el medio con 2 g/L.

Un cuarto factor importante y reconocido en todas las investigaciones realizadas en el cultivo de tejidos vegetales corresponde al genotipo, el crecimiento de tejidos y órganos cultivados, así como la regeneración *in vitro* están muy influenciados por el genotipo. Existen muchos ejemplos en la literatura donde los resultados obtenidos para una variedad de planta varía demasiado frente a otra, siendo los efectos del genotipo una de las mayores limitaciones para el cultivo de tejidos vegetales (George *et al.*, 2008). Cada accesión responde de manera particular al tratamiento probado y presenta un periodo de viabilidad específico. Entre nuestros resultados se corrobora los datos del Centro Internacional de la Papa (CIP) en donde las accesiones denominadas 55, 59 y 79 son las que presentan un periodo de vida menor en relación a la accesión denominada 51, pero el tiempo de viabilidad de nuestros explantes aumento considerablemente comparado al periodo entre subcultivo que indicó el CIP.

Tomando en consideración que el medio control es el que actualmente es usado en el INIA y da resultados de 4-6 meses de vida promedio entre las diferentes accesiones debemos hacer hincapié en que nuestros resultados son muy favorables en comparación con este medio. El tratamiento T1 o control, que contiene 20 g/L de sucrosa, 0 g/L de sorbitol y 0 mg/L de ácido ascórbico, tiene una probabilidad de supervivencia inferior al 20%, observándose una caída considerable en doceavo mes de la experimentación; además de presentar alta severidad de defoliación, necrosis, clorosis y fenolización, siendo esta última característica la más influyente en el cultivo de tejidos de dicha especie puesto que llena el medio de sustancias tóxicas para los explantes, por otro lado si bien hay un buen enraizamiento en este tratamiento, esto da como resultado que se consuman los nutrientes del medio en el menor tiempo posible, debido a que este tratamiento no contiene concentración alguna de sorbitol, por otra parte el T11, que contiene 40 g/L de sucrosa, 20 g/L de sorbitol y ácido ascórbico, nos muestra los mejores resultados primero indicando que en los primeros meses de desarrollo no presenta un buen enraizamiento pero la alta concentración de sucrosa hace que disponga de energía inmediata para poder soportar el estrés osmótico generado por el sorbitol, esta sustancia a su vez regula el consumo de los nutrientes del medio y para finalizar la presencia del ácido ascórbico en el medio disminuye la presencia de fenolización en este, disminuyendo la toxicidad a la que se somete el explante, como resultado el tratamiento T11 tiene una probabilidad de supervivencia mayor a 30% luego de los 17 meses de experimentación.

6.2. Regeneración en medio control

Con respecto a los resultados de longitud, número de nudos y peso obtenidos en los explantes con diferente tratamiento de origen, tenemos que indicar que nuestros explantes han podido ser afectados por un fenómeno denominado habituación, debido al largo periodo de tiempo al que han sido sometidos en los medios de conservación. La

habituaación se da en el cultivo de tejidos vegetales, donde las células vegetales cambian sus requerimientos exógenos para generar una respuesta específica, volviéndose autosuficiente para realizar esta respuesta sin ser influenciada por el requerimiento exógeno. Esta condición solamente es generada hacia los compuestos orgánicos, por lo que las sales de los macro y microelementos presentes en el medio, no influyen en este fenómeno (George *et al.*, 2008).

El factor sucrosa no ha generado variaciones a nivel de longitud, número de nudos, ni peso de los explantes; tenemos que considerar que la sucrosa es un compuesto muy usado por el explante durante los primeros meses de la experimentación, por lo que es difícil que el explante pueda habituarse a este compuesto que se torna más escaso con el pasar del tiempo, podríamos considerar una habituación si la experimentación se realizara en un periodo tan corto como para que la influencia de la sucrosa no disminuya por su consumo.

El factor sorbitol puede haber generado habituación debido a que es metabólicamente inerte en esta especie, por lo que a lo largo de la experimentación no debe haber variado su concentración ni función como osmolito, pero sí debe haber condicionado la respuesta del explante. Los resultados nos indican que no hay diferencias significativas en la longitud, pero sí hay variación con respecto al número de nudos de donde no podemos inferir una clara relación con la concentración de sorbitol, pero podemos indicar que el efecto de sorbitol sería el aumento del número de nudos debido a la disminución de agua dentro de la célula y con esto la disminución de la longitud internodal generando un aumento del número de nudos; y la existencia de una variación en el peso de la muestra debido a la habituación antes mencionada, la influencia de sorbitol puede generar disminución de crecimiento longitudinal (Tapia, 1990); o influir en el peso de los explantes

aumentando las superficies suberizadas y el peso seco, y en tejidos diferenciados hay un aumento de la lignificación (Doley y Leyton, 1968).

El factor ácido ascórbico presenta diferencias significativas en la longitud del explante y el número de nudos, para los cuales es difícil indicar alguna función del ácido ascórbico en el potencial osmótico dentro de las células, por lo que atribuimos estos resultados a interacciones de los factores como accesión y sorbitol.

Por último el factor accesión, es un factor que claramente se ha indicado como determinante en cualquiera de los experimentos sobre cultivo de tejidos vegetales, y si tomamos en consideración el tema de la habituación se atribuye a factores genéticos y epigenéticos, podemos indicar que es un fenómeno dirigido y no aleatorio, son restrictos a la capacidad genética, potencialmente reversibles y no alteran la totipotencia (Meins y Lutz, 1980). Por lo que debe ser un factor a tener en cuenta en las regeneración de las accesiones luego de ser sometidas a periodos de estrés para su conservación, si bien en nuestros experimentos tenemos en consideración que no hay habituaciones que puedan afectar la viabilidad de la planta, es posible que en ciertos genotipos se generen respuestas poco esperadas, por lo que es mejor retirar todo tipo de habituación en el explante antes de someterlo a un medio de conservación.

6.3. Verificación de la estabilidad morfológica y genética

Considerando que nuestra caracterización morfológica presenta variables cualitativas o categóricas, realizamos un Análisis de Correspondencia Múltiple con el fin de observar los agrupamientos generados entre nuestros clones de una misma accesión luego de ser sometidos a diferentes medios de conservación. Las características fueron evaluadas siguieron lo indicado en el manual de Descriptores de Oca (IPGRI/CIP, 2001) a excepción del tiempo de evaluación debido a que correspondió a 90 días de siembra en macetas.

Tampoco se pudo evaluar todos los descriptores debido a las condiciones climáticas poco favorables para el normal desarrollo de la oca, por lo que se evaluaron 12 descriptores de los 18 indicados y un descriptor extra relacionado a la longitud de los foliolos, los descriptores faltantes están relacionados a la flor y fruto de la planta.

De acuerdo a estudios sobre caracterización morfológica en diferentes tubérculos andinos, se indica que los descriptores con mayor diferenciación son el color de los tallos aéreos, pigmentación de axilas, color de follaje, color de flor, color de pedúnculo y pedicelo, color de la superficie de los tubérculos, color de pulpa y forma de tubérculo (Morillo *et al.*, 2019). Entre nuestros resultados se indica que los descriptores de color secundario, distribución de color secundario, altura de la planta, pigmentación de axilas y forma de tubérculos son más discriminantes dos dimensiones, mientras que otros trabajos haciendo uso de los mismos descriptores para la caracterización de Oca encuentran que las características más discriminantes corresponden al color de sépalos, forma de la corola, el color de las flores, presencia de estipulas y el color de los tallos aéreos (Mamani, 2005), y otros indican la importancia del color del peciolo, distribución del color secundario de los tubérculos, color de tallos aéreos, color de envés del foliolo, habito de floración, color de superficie de tubérculo, peso de tubérculo y número de tubérculos por planta (Morrillo *et al.*, 2019).

En nuestro dendograma de HCPC se puede observar claramente que existen 4 grupos bien definidos correspondientes a las 4 accesiones usadas para la experimentación, a su vez los individuos no presentan diferencia alguna entre las muestras del mismo genotipo indicando que los descriptores han sido homogéneos para todos los individuos y no existe algún tipo de diferenciación generado por el sometimiento a diferentes medios de conservación que induciría a una situación de estrés a los explantes.

Contrastando nuestros resultados con los obtenidos por ambos autores debemos indicar lo siguiente, para el caso de Mamani 2005 se ha hecho la caracterización de 11 variedades de oca, las cuales han podido ser caracterizadas de manera completa debido a las condiciones climáticas favorables obteniéndose datos de forma de corola y color de flores, pero no se precisa el uso de una paleta de colores como referencia lo que podría dificultar la observación de las pequeñas diferencias entre las intensidades de color. Por otra parte el trabajo de Morrillo 2019 hace uso de una metodología más refinada y objetiva, utiliza un colorímetro digital que usa el sistema CIELab haciendo más objetivas las medidas y no dependiente de la luminosidad que se le pueda dar a la imagen (Kaur y Kranthi, 2012), además de hacer uso de otros descriptores (Rosero, 2010) realizando un Análisis de Componentes Principales (PCoA).

Por lo que no encontramos diferencias fenotípicas entre las plantas control y las plantas obtenidas del tratamiento 11, podemos indicar que no han existido alguna mutación o variación somaclonal observable. Según investigaciones anteriores, este tipo de variación a nivel fenotípico puede detectarse en cambios fenotípicos visibles como el vigor, la producción, calidad, pigmentación o resistencia a enfermedades, y es posible observarlos comparando si existen diferencias entre el fenotipo parental y el fenotipo donde puede haber ocurrido el cambio (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009), caso que no ha sido observado en nuestra caracterización aunque no se haya realizado la evaluación de todos los descriptores.

Por otra parte, los marcadores moleculares se han convertido en las herramientas más deseables para establecer la uniformidad genética de las plantas micropropagadas (Joshi y Dawhan, 2007) y comparado a otras metodologías como AFLP o RFLP, los marcadores ISSR y SSR tienen menores costos, altos niveles de reproducibilidad, no presenta los riesgos de la radioactividad y requiere muy bajas cantidades de DNA (Meyer *et al.*, 1993;

Fang y Roose, 1997) por lo que no representa un riesgo para las plántulas obtenidas de *in vitro*, siendo esto uno de los motivos para la selección de esta metodología.

Tenemos resultados que indican la ausencia de variación somaclonal para todas las accesiones con las que hemos trabajado, las cuales luego de la amplificación de los 8 juegos de primers nos indican que todos mantienen la misma integridad genética, habiendo anteriores investigaciones que hacen uso de diferentes tipos de marcadores moleculares como RAPDs e ISSRs en banano para corroborar la estabilidad genética en micropropagación (Lakshmanan *et al.*, 2007), RAPDs e ISSR en plantas de almendra haciendo uso también de protocolos de micropropagación (Martins *et al.*, 2004), en donde todos llegan a la conclusión sobre la fidelidad genética entre las plantas madres y las propagadas, indicando incluso que la multiplicación axilar es el modo de propagación más seguro para producir individuos con la misma constitución genética (Joshi y Dawhan, 2007).

En los trabajos de conservación de banco de germoplasma *in vitro* debemos tener en cuenta los diferentes factores que podrían inducir a la aparición de variaciones somaclonales: el patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* (Sánchez-Chiang y Jimenez, 2009), la edad de los cultivos propagados y la cantidad de subcultivos indicando que la variación podría aparecer luego de 3-8 subcultivos (Sahijram *et al.*, 2003), y por otra parte puede estar los componentes del medio de cultivo como las hormonas o reguladores de crecimiento tanto como el estado físico del medio que podría generar la formación de etanol por falta de oxigenación en los tejidos (Sahijram *et al.*, 2003; Levitus *et al.*, 2010). Por otro lado, extensos trabajos se han realizado con fines del entendimiento de los mecanismos que conllevan a las variaciones somaclonales que usualmente ocurren como una respuesta al estrés impuesto en la planta por las condiciones del cultivo y se manifiestan como arreglos cromosómicos,

mutaciones puntuales y metilaciones de DNA (Phillips *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2004), también puede ocurrir como consecuencia de la activación de retrotransposones como resultado de condiciones de estrés y permiten la aparición de mutaciones puntuales (Hirochika *et al.*, 1996).

Con los resultados obtenidos podemos indicar que si bien existe la posibilidad de la generación de mutaciones por la metodología de conservación *in vitro* donde sometemos a los explantes a situaciones de estrés, las accesiones con las que hemos trabajado han mantenido claramente su estabilidad genética en los subcultivos y en su siembra en medio de conservación, esto es un aspecto que se debe tener en consideración siendo el fin de la conservación de un banco de germoplasma *in vitro* el mantenimiento de la diversidad genética de una especie y las variaciones somaclonales si bien generan mayor diversidad genética dentro del banco, esto generaría datos inexactos respecto a su caracterización agronómica, morfológica y genética.

7. CONCLUSIONES

- El medio de conservación con mejores resultados es el T11 (40 g/L de sucrosa, 20 g/L de sorbitol y 100 mg/L de ácido ascórbico) que disminuyó todas las sintomatologías relacionadas a daños, malformaciones o problemas en la nutrición de los explantes hasta el periodo de 12 meses.
- Entre los diferentes descriptores evaluados debemos indicar que la fenolización del medio es el más relevante en relación a viabilidad del explante.
- Los componentes del medio actúan de diferente forma en el experimento: la sucrosa es una fuente de energía inmediata, el sorbitol regula y letarga el consumo del medio de cultivo, y el ácido ascórbico protege los tejidos frente al estrés del experimento.
- Los explantes luego de ser sometidos al estrés del medio de conservación, no presentan ninguna limitante fisiológica para su correcta regeneración en un medio control.
- Los medios de cultivo para conservación de oca usados en nuestro experimento mantienen las características genéticas y morfológicas de las muestras luego de ser sometidas a estos tratamientos.

8. RECOMENDACIONES

- El medio seleccionado en este trabajo podría ser perfeccionado mediante la evaluación de la cantidad de ROS producidas en los explantes. Si bien la acción del ácido ascórbico es de disminuir los daños causados por las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los compuestos fenólicos del medio, no se puede conocer claramente cuál es la concentración de compuestos fenólicos en el medio que generan la muerte del explante o la posible acción del antioxidante en los últimos periodos de la experimentación, por lo que sería recomendable un análisis de cuantificación de antioxidantes en el medio al final de una experimentación similar.
- Si bien las cámaras de conservación del INIA llegan a temperaturas de 15°C, existen bancos de germoplasma para conservación que tienen menor temperatura, para los cuales se recomienda usar un tratamiento que no sea tan estresante puesto que el aumento del estrés por temperatura en el explante podría conllevar a su muerte.
- Realizar una evaluación del efecto de diferentes intensidades de iluminación sobre la sobrevivencia de los explantes. Existen metodologías existentes para disminuir la oxidación de compuestos fenólicos o daños por ROS como la disminución de la iluminación en las cámaras de conservación.
- Se ve necesaria la investigación en el aspecto epigenómico y epigenético del cultivo de tejidos, debido a que hay variaciones en las respuestas al medio dependiendo de la edad de desarrollo de los explantes en el medio y la información referente a esto que también podría relacionarse a la habituación del tejido es escasa.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAZAMI, M. A.; TORABI, M.; JALILI, E. In vitro response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. *African Journal of Biotechnology*, 2010, vol. 9, no 26, p. 4014-4017.

ALVAREZ, V.; GANDARILLAS, A.; COTE, EN FERNANDEZ-NORTH. Selección positiva: una técnica de producción de tubérculos semilla de papa. *Manual Técnico*, 1992, vol. 2, p. 92.

AYALA, Guido. Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. *Seminario, J. et al.(Edts). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento ya la capacitación*, 2004, p. 101-112.

BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. In vitro conservation of Musa germplasm: effects of mannitol and temperature on growth and storage. *Journal of horticultural science*, 1993, vol. 68, no 6, p. 841-846.

BOHR, Vilhelm A.; DIANOV, Grigory L. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie*, 1999, vol. 81, no 1-2, p. 155-160.

BONNER, James; AXTMAN, Grice. The growth of plant embryos in vitro. Preliminary experiments on the role of accessory substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1937, vol. 23, no 8, p. 453.

BRUVO, R.; MICHIELS, N. K., D'SOUZA, T. G.; SCHULENBURG, H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular ecology*, 2004, vol. 13, no 7, p. 2101-2106.

CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; ARBIZU, C.; ROCA, W.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean

tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, vol. 86, no 10, p. 1481-1488.

CHENEVARD, D.; JAY-ALLEMAND, C.; GENDRAUD, M.; FROSSARD, J. S. The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* x *Juglans regia*). Consequences on their survival during acclimatization. En *Annales des sciences forestières*. EDP Sciences, 1995. p. 147-156.

CLARK, Lindsay V. polysat version 1.7 Tutorial Manual. *Urbana-Champaign: University of Illinois Department of Crop Sciences*. Available at <https://github.com/lvclark/polysat/wiki>, 2019.

CONNER, A. J.; FALLOON, Peter G. Osmotic versus nutritional effects when rooting in vitro asparagus minicrowns on high sucrose media. *Plant science*, 1993, vol. 89, no 1, p. 101-106.

CORTÉS, H. Algunos aspectos del avance de la investigación en el Programa de Investigación de Cultivos Andinos (CICA). Programas de Investigación: papa, oca, tarwi, kiwicha, quinua. Kaira-Cusco, Universidad Nacional de San Antonio Abad, Cusco, Perú. 1984.

DE KLERK-KIEBERT, Yvonne M.; VAN DER PLAS, Linus HW. Relationship of respiratory pathways in soybean cell suspensions to growth of the cells at various glucose concentrations. *Plant cell, tissue and organ culture*, 1985, vol. 4, no 3, p. 225-233.

DE MENDIBURU, Felipe; DE MENDIBURU, Maintainer Felipe. Package 'agricolae'. *R package version*, 2020, p. 1.2-8.

DE PINTO, M. C.; FRANCIS, D.; DE GARA, L. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 1999, vol. 209, no 1-2, p. 90-97.

DELGADO, M.A. Identificación del microorganismo causal de la pudrición de tubérculos de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.). 3er Congreso Internacional de Cultivos Andinos. La Paz. IBTA/CIID La Paz, Bolivia. 1982. p: 357.

DOLEY, D.; LEYTON, Ls. Effects of growth regulating substances and water potential on the development of secondary xylem in *Fraxinus*. *New Phytologist*, 1968, vol. 67, no 3, p. 579-594.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, vol. 12, no 13, p. 39-40.

EDELMAN, J.; HANSON, A. D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot-tissue 2: The effect of composition of the culture medium. *Journal of Experimental Botany*, 1972, vol. 23, no 2, p. 469-478.

ELSTNER, E. F. Oxygen radicals—biochemical basis for their efficacy. *Klinische Wochenschrift*, 1991, vol. 69, no 21-23, p. 949-956.

ESPINOSA, A.; SALAS, L.; GONZÁLEZ, O.; SILVA, J. J. Empleo del ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. *Biotechnología vegetal*, 2002, vol. 2, no 1, p. 39-42.

ESTRELLA, M. Conservación de germoplasma mediante cultivo de tejidos. 1983.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, vol. 95, no 3, p. 408-417.

FRITSCHÉ-NETO, Roberto; BORÉM, Aluizio (ed.). *Plant breeding for abiotic stress tolerance*. Springer Science y Business Media, 2012, p. 94-95.

FLORES, Teresita; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; FLORES, H. E. Ocatin. A novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiology*, 2002, vol. 128, no 4, p. 1291-1302.

FOYER, Christine; ROWELL, Jackie; WALKER, David. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*, 1983, vol. 157, no 3, p. 239-244.

FUKAMI, T.; HILDEBRANDT. AC. Growth and chlorophyll formation in edible green plant callus tissues in vitro on media with limited sugar supplements. *BOTANICAL MAGAZINE-TOKYO*, 1967, vol. 80, no 947, p. 199-&.

GARCÍA-ÁGUILA, Leyanis; DE FERIA, Manuel; ACOSTA, Karen. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotechnología Vegetal*, 2007, vol. 7, no 2.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 2002, vol. 37, no 3, p. 263-285.

GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; DE KLERK, Geert-Jan. *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, 2008. p. 65-113. p. 122-180 p. 261-281 p.355-401

- GOLDBACH, H.; AMBERGER, A. Influence of boron deficiency on 3H indole-3yl-acetic acid uptake and efflux in cell cultures of *Daucus carota* L. *Plant growth regulation*, 1986, vol. 4, no 1, p. 81-86.
- GOLMIRZAIE, Ali; TOLEDO, Judith. Noncryogenic, long-term germplasm storage. En *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, 1999. p. 95-101.
- GOPAL, Jai; y IWAMA, Kazuto. *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant cell reports*, 2007, vol. 26, no 5, p. 693-700.
- GOULD, Alan R. Factors controlling generation of variability *in vitro*. *Plant regeneration and genetic variability*, 1986, p. 549-567.
- GRAU, A.; HALLOY, S. Feast or famine. *Growing Today June*, 1994, vol. 1994, p. 29-33.
- GREENWOOD, Norman Neill. *THE CHEMISTRY OF BORON*. NOTTINGHAM UNIV (ENGLAND) DEPT OF CHEMISTRY, 1962.
- GROUT, B. W. V. Conservation *in vitro*. En *International Symposium on Plant Biotechnology and its Contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement* 289. 1991. p. 171-178.
- HAGEGE, D. Habituation in plant cell cultures: adaptation to free radical attacks?. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, 1995, vol. 189, no 6, p. 1183-1190.
- HAMMOND, S. D. H.; VIEHMANNOVA, I.; ZAMECNIK, J.; PANIS, B.; CEPKOVA, P. H. Efficient slow-growth conservation and assessment of clonal fidelity of *Ullucus tuberosus* Caldas microshoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2019, vol. 138, no 3, p. 559-570.

HELGESON, John P.; UPPER, C. D.; HABERLACH, G. T. Medium and tissue sugar concentrations during cytokinin-controlled growth of tobacco callus tissues. En *Plant Growth Substances 1970*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1972. p. 484-492.

HENSHAW, G. G. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. *Crop genetic resources for today and tomorrow*, 1975, p. 349-358.

HIROCHIKA, H.; SUGIMOTO, K.; OTSUKI, Y.; TSUGAWA, H.; KANDA, M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, vol. 93, no 15, p. 7783-7788.

HUSSAIN, Town Mohammad; CHANDRASEKHAR, Thummala; GOPAL, Ghanta Rama. Micropropagation of *Sterculia urens* Roxb., an endangered tree species from intact seedlings. *African journal of biotechnology*, 2008, vol. 7, no 2.

IPGRI/CIP. 2001. Descriptores de Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Centro Internacional de la Papa, Lima Perú.

JARVIS, Devra I.; MYER, Landon; KLEMICK, Heather. *A training guide for in situ conservation on-farm*. Bioversity International, 2000.

JOSHI, P.; DHAWAN, V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. *Biologia plantarum*, 2007, vol. 51, no 1, p. 22-26.

JOY, Richard W.; PATEL, Kamlesh R.; THORPE, Trevor A. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1988, vol. 13, no 3, p. 219-228.

KAUR, Amanpreet; KRANTHI, B. V. Comparison between YCbCr color space and CIELab color space for skin color segmentation. *International Journal of Applied Information Systems*, 2012, vol. 3, no 4, p. 30-33.

KING, Steven R.; GERSHOFF, Stanley N. Nutritional evaluation of three underexploited andean tubers: *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae), *Ullucus tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaeolaceae). *Economic Botany*, 1987, vol. 41, no 4, p. 503-511.

LAKSHMANAN, Venkatachalam; REDDAMPALLI VENKATARAMAREDDY, Sreedhar; NEELWARNE, Bhagyalakshmi. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2007, vol. 10, no 1, p. 106-113.

LEVITUS, Gabriela, et al. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*, 2010, p.81.

LISO, R.; INNOCENTI, A. M.; BITONTI, M. B.; ARRIGONI, O. Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. *New Phytologist*, 1988, vol. 110, no 4, p. 469-471.

LÓPEZ, C. Vitricación de plantas cultivadas *in vitro* (en línea). Encuentros en la Biología no. 28. Universidad de la Rioja, España. Consultado 26 feb. 2010. 1996.

LUMSDEN, P. J.; PRYCE, S.; LEIFERT, C. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. En *Progress in plant cellular and molecular biology*. Springer, Dordrecht, 1990. p. 108-113.

MAMANI, J. *Caracterización morfológica de germoplasma de tubérculos en el municipio de Ancoraimes, cantones Ch" ejepampa y Ch" ojñapata*. 2005. Tesis Doctoral. Tesis de grado, Facultad de Agronomía, UMSA. La Paz, Bolivia.

MARTÍNEZ, Isaura Martín. *Conservación de recursos fitogenéticos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General de Estructuras, 2001.

MARTINS, M.; SARMENTO, D.; OLIVEIRA, M. M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant cell reports*, 2004, vol. 23, no 7, p. 492-496.

MAXTED, N.; GUARINO, L.; MYER, L.; CHIWONA, E. A. Towards a methodology for on-farm conservation of plant genetic resources. *Genetic resources and crop evolution*, 2002, vol. 49, no 1, p. 31-46.

MEINS JR, F.; LUTZ, J. Epigenetic changes in tobacco cell culture: studies of cytokinin habituation. 1980.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, vol. 31, no 9, p. 2274-2280.

MORILLO, C.; CRUZ, A.; MORILLO, C.; LEGUIZAMO, M.; FERNANDA, M. Caracterización morfológica y molecular de *Oxalis tuberosa* Mol. en el departamento de Boyacá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2019, vol. 21, no 1, p. 18-28.

MUÑOZ, Laura. *Respuesta al establecimiento y conservación in vitro de melloco, oca, y mashua*. 1988. Tesis Doctoral. Tesis Ledo. Biol. Departamento de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962, vol. 15, no 3, p. 473-497.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M. F.; SGHERRI, C. M. L. Superoxide generation in relation to dehydration and rehydration. 1996.

PHILLIPS, Ronald L.; KAEPPLER, Shawn M.; OLHOFT, Paula. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, vol. 91, no 12, p. 5222-5226.

POMAR VELA, Gerardo Manuel. Tuberización *in vitro* de *Oxalis tuberosa* Mol." Oca" como una alternativa para la producción de tubérculo semilla. 2002. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

POPENOE, H.; KING, S. R.; LEÓN, J.; KALINOWSKI, L. S. Lost crops of the Incas. *Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington*, 1989, p. 139-161.

QUADRANA, Leandro; COLOT, Vincent. Plant transgenerational epigenetics. *Annual Review of Genetics*, 2016, vol. 50, p. 467-491.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.

RARE, E. Stress physiology: the functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *Journal of Horticultural Science*, 1990, vol. 65, no 3, p. 231-243.

RAYAS, Aymé, MEDEROS, V.; García, M.; LÓPEZ, J.; CABRERA, L.; VENTURA, J.; MARTÍNEZ, M.; GUTIÉRREZ, V.; ÁLVAREZ, M.; BAUTA, M. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal*, 2002, vol. 2, no 4.

REBASA, Pere. Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *Cirugía española*, 2005, vol. 78, no 4, p. 222-230.

RIERA, M.; VALON, C.; FENZI, F.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. *Physiologia Plantarum*, 2005, vol. 123, no 2, p. 111-119.

ROCA, W. M.; ESCOBAR, R.; MAFLA, G. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*: principios y técnicas. *CIAT, Cali*, 1994.

ROSERO, M. Colección, caracterización y conservación de variabilidad genética de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) en agroecosistemas paramunos del departamento de Nariño-Colombia. *Trabajo de grado para optar el título de Magister en Ciencias Línea De Investigación Recursos Fitogenéticos Neotropicales* facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Colombia-Palmira, 2010.

ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. Royal Horticultural Society Colour Chart. London :The Society, 2015.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 2003, vol. 39, no 6, p. 551-556.

SÁNCHEZ-CHIANG, Neiva; JIMÉNEZ, Víctor M. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana*, 2009, vol. 20, no 1, p. 135-151.

SÁNCHEZ-CHIANG, Neiva; JIMÉNEZ, Víctor M. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía mesoamericana*, 2010, vol. 21, no 1, p. 193-205.

SARKAR, Debabrata; NAIK, Prakash S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica*, 1998, vol. 102, no 2, p. 275-280.

SEMINARIO CUNYA, J. *Cultivos andinos: la oca, Oxalis tuberosa* Mol. Universidad Nacional de Cajamarca (Peru); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Lima (Peru), 1988.

- SEGUÍ SIMARRO, José María. *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Editorial Universitat Politècnica de València, 2011. p. 23-32.
- SMIRNOFF, Nicholas. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current opinion in plant biology*, 2000, vol. 3, no 3, p. 229-235.
- TAPIA, C.; ESTRELLA J.; MONTEROS, A.; VALVERDE, F.; NIETO, M.; CÓRDOVA, J. Manejo y conservación de RTAs in situ en fincas de agricultores y ex situ en el Banco de Germoplasma de INIAP. 2004.
- TAPIA, B., *et al.* Conservación *in vitro* de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) y mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. y P.) "Santa Catalina"-INIAP. 1990.
- THOMPSON, J. E.; LEGGE, R. L.; BARBER, R. F. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 1987, vol. 105, no 3, p. 317-344.
- THORPE, Trevor A. History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 2007, vol. 37, no 2, p. 169-180.
- VAN SAMBEEK, J. W., *et al.* In vitro establishment of tissues from adult black walnut. *UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOREST SERVICE GENERAL TECHNICAL REPORT NC*, 1997, p. 78-92.
- VELARDE, A. *Modulación del transporte iónico por poliaminas y especies reactivas de oxígeno y su posible impacto en la respuesta de plantas al estrés salino*. Tesis Doctoral, p. 89. Tesis de Maestría. México. *Universidad de Colima*. 2009.
- VIETMEYER, Noel. Los cultivos olvidados de los incas. *CERES*, 1984, vol. 99, p. 37-40.
- WHITE, Philip R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*, 1939, p. 59-64.

WITHERS, Lyndsey A. 4. In-vitro conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1991, vol. 43, no 1, p. 31-42.

XU, Mingliang; LI, Xiangqian; KORBAN, Schuyler S. DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, vol. 109, no 5, p. 899-910.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I. A. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 2013, vol. 40, no 4, p. 2837-2849.

YILDIZ, Mustafa; ONDE, S.; OZGEN, M. Sucrose effects on phenolic concentration and plant regeneration from sugarbeet leaf and petiole explants. *Journal of Sugar Beet Research*, 2007, vol. 44, no 1/2, p. 1.

ZIETKIEWICZ, Ewa; RAFALSKI, Antoni; LABUDA, Damian. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, vol. 20, no 2, p. 176-183.

10. ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del Stock de Ácido Ascórbico

1. Diluir 8 g de ácido ascórbico en 40 ml de agua ultrapura
2. Calibrar el pH de la solución a 5.6
3. Esterilizar la solución por medio de filtros de 0.22 μ m en un frasco oscuro estéril
4. Se mantiene esta solución en congelamiento hasta su uso.

ANEXO 2

Preparación del Stock de Vitaminas

1. En 80 ml de agua destilada se agrega 200 g de glicina, 50 g de ácido nicotínico, 50 g de piridoxina y 10 g de tiamina.
2. Agitar hasta su dilución completa y luego enrasar a 100 ml.

ANEXO 3

Preparación del medio Murashige y Skoog y los diferentes tratamientos a evaluarse

1. Diluir 4.33 g/L de sales Murashige y Skoog en 500 ml de agua destilada y agitar hasta diluir completamente las sales
2. Agregar la sucrosa (20 g/L en los tratamientos 1-6 y 40 g/L en los tratamientos 7-12) y agitar hasta diluir la sucrosa
3. Agregar el sorbitol (0 g/L en los tratamientos 1, 4, 7 y 10, 20 g/L en los tratamientos 2, 5, 8 y 11 y 40 g/L en los tratamientos 3, 6, 9 y 12) y agitar hasta diluir el sorbitol

4. Agregar 1 ml/L de las vitaminas del stock de vitaminas y agitar hasta su dilución
5. Agregar 0.1 g/L de myoinositol y agitar hasta su dilución
6. Agregar 2 mg/L de pantotenato de calcio y agitar hasta su dilución
7. Enrasar a 1 L y luego medir el pH a 5.6
8. Agregar 6.5 g/L de agar
9. En el caso de los tratamientos 1, 2, 3, 7, 8 y 9 se coloca en el microondas hasta fundir el agar y luego se dispensan 10 ml de medio en cada tubo de ensayo de 25x150 mm, para su posterior esterilización en el autoclave.
10. En el caso de los tratamientos que presentan ácido ascórbico (tratamientos 4, 5, 6, 10, 11 y 12), se esteriliza el medio en matraces y una vez estéril se espera que la temperatura del medio baje para poder agregarse 0.5 ml del stock de ácido áscorbico esterilizado mediante filtración, se agita bien el medio y se dispensa 10 ml del medio en tubos de ensayo de 25x150 mm con ayuda de una pipeta estéril.

ANEXO 4

Concentración de compuestos presentes en el medio Murashige y Skoog (1962)

Compuestos	mg/L
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1650.000
Ácido bórico (H_3BO_3)	6.200
Cloruro de calcio anhidro (CaCl_2)	332.200
Cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
EDTA disodio dihidratado ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.260
Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.800
Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	2.000
Sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4)	180.700
Sulfato de manganesio monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.900
Sal sódica de ácido molíbdico dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.250
Myo-inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	100.000
Ácido nicotínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	0.500
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Nitrato de potasio (KNO_3)	1900.000
Fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4)	170.000

Piridoxina hidrocliclida ($C_8H_{11}NO_3.HCl$)	0.500
Tiamina hidrocliclida ($C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$)	0.100
Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)	8.600
Pantotenato de calcio ($C_9H_{17}NO_5$)	2.000

ANEXO 5

Tabla de significancia estadística para el análisis normal de varianza (ANOVA) en los datos de medios de conservación

ANOVA de enraizamiento		Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	
	Pr(>Chi)					
	NULL			575	4743.9	
	sucrosa	1	822.97	574	3921.0	<
	2.2e-16 ***					
	sorbitol	2	143.45	572	3777.5	
	3.994e-06 ***					
	ascorbico	1	484.92	571	3292.6	<
	2.2e-16 ***					
	Code	3	15.33	568	3277.3	
	0.4476					
	sucrosa:sorbitol	2	519.99	566	2757.3	<
	2.2e-16 ***					
	sucrosa:ascorbico	1	19.32	565	2738.0	
	0.03044 *					
	sucrosa:Code	3	29.70	562	2708.3	
	0.06582 .					
	sorbitol:ascorbico	2	402.02	560	2306.2	<
	2.2e-16 ***					
	sorbitol:Code	6	18.80	554	2287.4	
	0.60175					
	ascorbico:Code	3	14.55	551	2272.9	

	0.31725					

	Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
ANOVA de		Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	
necrosis	Pr(>Chi)					
	NULL			575	46720	
	sucrosa	1	1897.7	574	44822	
	1.672e-09 ***					
	sorbitol	2	1661.4	572	43161	
	1.243e-07 ***					
	ascorbico	1	2278.1	571	40883	
	4.021e-11 ***					
	Code	3	11207.2	568	29675	<
	2.2e-16 ***					
	sucrosa:sorbitol	2	6390.7	566	23285	<
	2.2e-16 ***					
	sucrosa:ascorbico	1	371.4	565	22913	
	0.0009042 ***					
	sucrosa:Code	3	98.1	562	22815	
	0.4055988					
	sorbitol:ascorbico	2	709.5	560	22106	
	2.695e-05 ***					
	sorbitol:Code	6	1336.2	554	20769	
	5.383e-07 ***					
	ascorbico:Code	3	2191.4	551	18578	

	5.034e-14 ***					

	Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
ANOVA de		Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	
defoliación	Pr(>Chi)					
	NULL			575	25264	
	sucrosa	1	601.27	574	24663	
	2.439e-05 ***					
	sorbitol	2	2641.38	572	22022	<
	2.2e-16 ***					
	ascorbico	1	25.63	571	21996	
	0.3836					
	Code	3	2821.60	568	19174	<
	2.2e-16 ***					
	sucrosa:sorbitol	2	2014.61	566	17160	<
	2.2e-16 ***					
	sucrosa:ascorbico	1	169.54	565	16990	
	0.0111216 *					
	sucrosa:Code	3	265.09	562	16725	
	0.0179119 *					
	sorbitol:ascorbico	2	152.38	560	16573	
	0.0552103 .					
	sorbitol:Code	6	1540.80	554	15032	
	8.744e-11 ***					
	ascorbico:Code	3	539.04	551	14493	

	0.0001341 ***				

	Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
ANOVA de		Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev
clorosis	Pr(>Chi)				
	NULL			575	59554
	sucrosa	1	961.0	574	58593
	0.0004251 ***				
	sorbitol	2	188.4	572	58405
	0.2959448				
	ascorbico	1	9579.5	571	48825
	2.2e-16 ***				<
	Code	3	4870.6	568	43955
	1.383e-13 ***				
	sucrosa:sorbitol	2	2544.9	566	41410
	7.184e-09 ***				
	sucrosa:ascorbico	1	81.8	565	41328
	0.2723769				
	sucrosa:Code	3	94.6	562	41233
	0.7070655				
	sorbitol:ascorbico	2	11.6	560	41222
	0.9182093				
	sorbitol:Code	6	3327.4	554	37895
	7.341e-09 ***				
	ascorbico:Code	3	504.5	551	37390

	0.0592654 .				

	Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
ANOVA de		Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev
fenolización	Pr(>Chi)				
	NULL			575	47427
	sucrosa	1	492.3	574	46935
	0.00595 **				
	sorbitol	2	173.1	572	46762
	0.26452				
	ascorbico	1	5810.9	571	40951
	2.2e-16 ***				<
	Code	3	3991.1	568	36960
	3.046e-13 ***				
	sucrosa:sorbitol	2	1595.7	566	35364
	5.136e-07 ***				
	sucrosa:ascorbico	1	59.1	565	35305
	0.300344				
	sucrosa:Code	3	216.9	562	35088
	0.268268				
	sorbitol:ascorbico	2	42.6	560	35045
	0.679421				
	sorbitol:Code	6	4140.9	554	30905
	3.559e-14 ***				
	ascorbico:Code	3	547.7	551	30357

	0.019066 * - --- Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
--	---

ANEXO 6

Tabla de significancia estadística para la prueba de Wilcoxon debido a la ausencia de normalidad

Pruebas de Homogeneidad y Normalidad para la longitud	Prueba de Shapiro-Wilk para Longitud	<p>Shapiro-Wilk normality test</p> <p>data: datosregeneracion\$long</p> <p>W = 0.98457, p-value = 5.597e-05</p> <p>#Menor a la significancia por lo que no hay normalidad</p>
	Prueba de Levene en Longitud para los factores	<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 1 0.8361 0.361</p> <p>478</p> <p>#La longitud relacionado al factor sucrosa es homogéneo</p>
		<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 2 1.3888 0.2504</p> <p>477</p> <p>#La longitud relacionado al factor sorbitol es homogéneo</p>

		<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 1 4.2042 0.04087 *</p> <p>478</p> <p>#La longitud relacionado al factor ascorbico es no homogéneo</p>
		<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 3 26.375 8.492e-16 ***</p> <p>476</p> <p>#La longitud relacionado al factor accesión es no homogéneo</p>
Pruebas de Homogeneidad y Normalidad para el número de nudos	Prueba de Shapiro-Wilk para Número de Nudos	<p>Shapiro-Wilk normality test</p> <p>data: datosregeneracion\$nud</p> <p>W = 0.98886, p-value = 0.001029</p> <p>#Menor a la significancia por lo que no hay normalidad</p>
	Prueba de Levene en Número de Nudos para los	<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p>

	factores	group 1 2.2765 0.132 478 #El número de nudos relacionado al factor sucrosa es homogéneo
		Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median) Df F value Pr(>F) group 2 0.6679 0.5133 477 #El número de nudos relacionado al factor sorbitol es homogéneo
		Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median) Df F value Pr(>F) group 1 1.436 0.2314 478 #El número de nudos relacionado al factor ascorbico es homogéneo
		Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median) Df F value Pr(>F) group 3 3.5434 0.0146 * 476 #El número de nudos relacionado al factor accesión es no homogéneo

Pruebas de Homogeneidad y Normalidad para el peso	Prueba de Shapiro-Wilk para Peso	<p>Shapiro-Wilk normality test</p> <p>data: datosregeneracion\$peso</p> <p>W = 0.96984, p-value = 2.229e-08</p> <p>#Menor a la significancia por lo que no hay normalidad</p>
	Prueba de Levene en Peso para los factores	<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 1 3.0202 0.08288</p> <p>478</p> <p>#El peso relacionado al factor sucrosa es homogéneo</p>
		<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 2 2.7751 0.06335</p> <p>477</p> <p>#El peso relacionado al factor sorbitol es homogéneo</p>
		<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p>

		<p>group 1 5.4124 0.02041 *</p> <p>478</p> <p>#El peso relacionado al factor ascórbico es no homogéneo</p>
		<p>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)</p> <p>Df F value Pr(>F)</p> <p>group 3 7.1277 0.0001084 ***</p> <p>476</p> <p>#El peso relacionado al factor accesión es no homogéneo</p>

ANEXO 7

Contribución de las características morfológicas en el MCA

Contribución	Dimensión 1	Dimensión 2
Color secundario del tallo	9.330	1.889
Distribución del color secundario	6.970	1.998
Altura de la planta	9.330	1.889
Pigmentación de axilas	0.065	10.361
Forma de tubérculos	3.627	6.237

ANEXO 8

Protocolo de Extracción de DNA de hojas de oca

1. Colectar 2 hojas jóvenes de oca en microtubos de 2 ml con 750 uL de CTAB 2x y 3.5 uL de b-mercaptoetanol.
2. Agregar una perla de acero en el microtubo y llevar a moler en el Tissue Lyzer por 4 minutos y una frecuencia de 30 Hz.
3. Llevar los microtubos con la muestra a baño maría por 45 minutos a una temperatura de 65°C, agitando la muestra cada 10 minutos.
4. Luego agregar 750 ul de Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1 a cada microtubo con 750 uL de CTAB 2x y agitar vigorosamente por algunos minutos.
5. Proceder a centrifugar el material por 15 minutos a 14000 rpm y coleccionar el sobrenadante que debe ser agregado en otro tubo microtubo de 2 ml estéril.

6. Agregar 80 uL de CTAB 10X e incubar en baño maría a 65°C por 10 minutos agitando cada 5 minutos.
7. Agregar 750 ul de Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1 a cada microtubo con 750 uL de CTAB 2x y agitar vigorosamente por algunos minutos.
8. Proceder a centrifugar el material por 15 minutos a 14000 rpm y coleccionar el sobrenadante que debe ser agregado en otro tubo microtubo de 1.5 ml estéril.
9. Agregar el mismo volumen de isopropanol y refrigerar por 30 minutos a -20°C.
10. Proceder a centrifugar el material por 10 minutos a 10000 rpm procediendo a descartar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet formado.
11. Agregar 500 uL de alcohol de 70° y colocar en el termomixer por 10 minutos a una temperatura de 10°C y 600 rpm.
12. Proceder a retirar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet, y agregar 500 uL de alcohol de 96°.
13. Colocar en el termomixer por 10 minutos a una temperatura de 10°C y 600 rpm, y descartar el sobrenadante con cuidado del pellet.
14. Colocar los microtubos con el pellet por 10 minutos en la centrifuga de vacío, usando una temperatura de 60°C y alcohol como solución.
15. Luego diluir el pellet en 150 uL de solución TE 10:1 y colocar en termomixer por 10 min a temperatura ambiente y a 400 rpm.
16. Digerir con 2 uL de RNAsa por 2 horas a 37°C
17. Conservar los microtubos a -70°C.

ANEXO 9

Concentración de Reactivos en PCR

Reactivos	Volumen para 100 reacciones (uL)
Agua libre de nucleasas	200
Buffer Bob	100
MgCl ₂ (20 mM)	25
dNTPs	40
Primer Forward	30
Primer Reverse	40
Fluoroforo	40
Taq Polimerasa	25

ANEXO 10

Primers SSRs y programa de amplificación

Denaturación inicial		
94°C	5 minutos	1 ciclo
Hibridación		
94°C	40 segundos	Ciclaje para cada primer
Temperatura del primer	40 segundos	
72°C	1 minuto	
Síntesis final		
72°C	5 minutos	1 ciclo

Nombre	Fw-secuencia	Rv-secuencia	Temperatura de alineamiento	Número de ciclaje	SSR motivo	Fluoróforo y placa
OT0538 5	CACGACGTTGTA AAACGACGGGCC TAAGTTGTTACAT ACCATGA	GGAGAAC ACCAAAC GGTGGA	58°C	32	Trinucleótido	Blue-II
OT2271 3	CACGACGTTGTA AAACGACCCTTG CTCTCTCCCTCG CAC	GTGCGGC AAGCTCC ACCTAT	56°C	30	Dinucleótido	Red-II
OT1187	CACGACGTTGTA	GCATTGC	58°C	31	Trinucleótido	Green-II

6	AAACGACTTGAA ATCAATGATGAA GTGGTAGCC	GACACGT CGACTC			leótid o	
OT0417 8	CACGACGTTGTA AAACGACTTTCC TAATTTGATGGA ACGATTT	CATGCCT CTTCAGTT ACAATTC A	56°C	30	Tetra nucle ótido	Blue-I
OT2524 6	CACGACGTTGTA AAACGACTGTGA GAAAGTGATGCA ACAAGAGAA	CAACCGT CAAGGCA GGTGTG	60°C	30	Trinuc leótid o	Red-I
OT2800 1	CACGACGTTGTA AAACGACTGGTT TAAGGGAAGGGA TGTTGC	CGTCGTC GTCGTCT CCAATG	54°C	29	Trinuc leótid o	Green-I
OT0463 6	CACGACGTTGTA AAACGACGAGCG ATAAGGGAACC CAGAAA	GGCCGTT CAATTTGG CCTCT	58°C	30	Trinuc leótid o	Yellow-I
OT2184 2	CACGACGTTGTA AAACGACGCTGC CTCCTCCACCTC CTT	CATGGAT CACTTCAA TAACGAT GAGC	54°C	30	Trinuc leótid o	Yellow-II

ANEXO 11

Resultados de los Microsatélites

Código	Accesión	Azul1	Amarillo1	Rojo1	Verde1	Azul2	Amarillo2	Rojo2	Verde2
51TC1	1	201	204	144	139	148	138	197	209
51TC1	1	206	213	146	148	152	141	200	224
51TC1	1	220	-9	-9	154	186	-9	209	232
51TC1	1	223	-9	-9	157	-9	-9	213	-9
51TC1	1	-9	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
51TC1	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC1	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC1	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC2	1	201	204	144	139	148	-9	197	209
51TC2	1	206	213	146	148	152	138	200	224
51TC2	1	220	-9	-9	154	186	141	209	232
51TC2	1	223	-9	-9	157	-9	-9	213	-9
51TC2	1	-9	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
51TC2	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC2	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC2	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC2	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC3	1	201	204	144	139	148	138	197	209
51TC3	1	206	213	146	148	152	141	200	224
51TC3	1	220	-9	-9	154	186	-9	209	232
51TC3	1	223	-9	-9	157	-9	-9	213	-9
51TC3	1	-9	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9

51TC3	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC3	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51TC3	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T111	1	201	204	144	139	148	138	197	209
51T111	1	206	213	146	148	152	141	200	224
51T111	1	220	-9	-9	154	186	-9	209	232
51T111	1	223	-9	-9	157	-9	-9	213	-9
51T111	1	-9	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
51T111	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T111	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T111	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T112	1	201	204	144	139	148	138	197	209
51T112	1	206	213	146	148	152	141	200	224
51T112	1	220	-9	-9	154	186	-9	209	232
51T112	1	223	-9	-9	157	-9	-9	213	-9
51T112	1	-9	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
51T112	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T112	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T112	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T113	1	201	204	144	139	148	138	197	209
51T113	1	206	213	146	148	152	141	200	224
51T113	1	220	-9	-9	154	186	-9	209	232
51T113	1	223	-9	-9	157	-9	-9	213	-9
51T113	1	-9	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
51T113	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9

51T113	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
51T113	1	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC1	2	201	204	144	139	148	135	197	209
55TC1	2	203	213	146	148	186	138	-9	224
55TC1	2	206	-9	-9	154	-9	141	-9	232
55TC1	2	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
55TC1	2	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
55TC1	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC1	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC1	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC2	2	201	204	144	139	148	135	197	209
55TC2	2	203	213	146	148	186	138	-9	224
55TC2	2	206	-9	-9	154	-9	141	-9	232
55TC2	2	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
55TC2	2	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
55TC2	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC2	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC2	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC3	2	201	204	144	139	148	135	197	209
55TC3	2	203	213	146	148	186	138	-9	224
55TC3	2	206	-9	-9	154	-9	141	-9	232
55TC3	2	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
55TC3	2	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
55TC3	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55TC3	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9

55TC3	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T111	2	201	204	144	139	148	135	197	209
55T111	2	203	213	146	148	186	138	-9	224
55T111	2	206	-9	-9	154	-9	141	-9	232
55T111	2	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
55T111	2	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
55T111	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T111	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T111	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T112	2	201	204	144	139	148	135	197	209
55T112	2	203	213	146	148	186	138	-9	224
55T112	2	206	-9	-9	154	-9	141	-9	232
55T112	2	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
55T112	2	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
55T112	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T112	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T112	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T112	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T113	2	201	204	144	139	148	135	197	209
55T113	2	203	213	146	148	186	138	-9	224
55T113	2	206	-9	-9	154	-9	141	-9	232
55T113	2	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
55T113	2	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
55T113	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T113	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
55T113	2	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9

59TC1	3	197	204	144	139	148	135	197	209
59TC1	3	201	213	146	148	186	138	-9	224
59TC1	3	206	-9	-9	154	-9	145	-9	232
59TC1	3	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
59TC1	3	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
59TC1	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC1	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC1	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC2	3	197	204	144	139	148	135	197	209
59TC2	3	201	213	146	148	186	138	-9	224
59TC2	3	206	-9	-9	154	-9	145	-9	232
59TC2	3	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
59TC2	3	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
59TC2	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC2	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC2	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC3	3	197	204	144	139	148	135	197	209
59TC3	3	201	213	146	148	186	138	-9	224
59TC3	3	206	-9	-9	154	-9	145	-9	232
59TC3	3	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
59TC3	3	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
59TC3	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC3	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59TC3	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T111	3	197	204	144	139	148	135	197	209

59T111	3	201	213	146	148	186	138	-9	224
59T111	3	206	-9	-9	154	-9	145	-9	232
59T111	3	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
59T111	3	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
59T111	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T111	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T111	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T112	3	197	204	144	139	148	135	197	209
59T112	3	201	213	146	148	186	138	-9	224
59T112	3	206	-9	-9	154	-9	145	-9	232
59T112	3	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
59T112	3	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
59T112	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T112	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T112	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T113	3	197	204	144	139	148	135	197	209
59T113	3	201	213	146	148	186	138	-9	224
59T113	3	206	-9	-9	154	-9	145	-9	232
59T113	3	220	-9	-9	157	-9	-9	-9	-9
59T113	3	223	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
59T113	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T113	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
59T113	3	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC1	4	197	204	144	139	148	138	197	209
79TC1	4	201	213	146	148	152	141	200	213

79TC1	4	206	-9	-9	154	160	-9	209	221
79TC1	4	209	-9	-9	157	186	-9	213	224
79TC1	4	213	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
79TC1	4	220	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC1	4	223	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC1	4	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC2	4	197	204	144	139	148	138	197	209
79TC2	4	201	213	146	148	152	141	200	213
79TC2	4	206	-9	-9	154	160	-9	209	221
79TC2	4	209	-9	-9	157	186	-9	213	224
79TC2	4	213	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
79TC2	4	220	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC2	4	223	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC2	4	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC3	4	197	204	144	139	148	138	197	209
79TC3	4	201	213	146	148	152	141	200	213
79TC3	4	206	-9	-9	154	160	-9	209	221
79TC3	4	209	-9	-9	157	186	-9	213	224
79TC3	4	213	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
79TC3	4	220	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC3	4	223	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79TC3	4	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T111	4	197	204	144	139	148	138	197	209
79T111	4	201	213	146	148	152	141	200	213
79T111	4	206	-9	-9	154	160	-9	209	221

79T111	4	209	-9	-9	157	186	-9	213	224
79T111	4	213	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
79T111	4	220	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T111	4	223	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T111	4	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T112	4	197	204	144	139	148	138	197	209
79T112	4	201	213	146	148	152	141	200	213
79T112	4	206	-9	-9	154	160	-9	209	221
79T112	4	209	-9	-9	157	186	-9	213	224
79T112	4	213	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
79T112	4	220	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T112	4	223	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T112	4	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T113	4	197	204	144	139	148	138	197	209
79T113	4	201	213	146	148	152	141	200	213
79T113	4	206	-9	-9	154	160	-9	209	221
79T113	4	209	-9	-9	157	186	-9	213	224
79T113	4	213	-9	-9	166	-9	-9	-9	-9
79T113	4	220	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T113	4	223	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9
79T113	4	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9	-9